

Aus der Klinik und Poliklinik  
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. H. Hepp)

**Nachweis Sekretorischer Aspartat Proteinasen im Vaginalsekret bei  
Frauen mit chronisch rezidivierender Vulvovaginalcandidose**

Dissertation  
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Stefan Brenninger  
aus

München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. E.R. Weissenbacher  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Frieze

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. habil. H. Spitzbart

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2005

meinen Eltern

0. Abkürzungen .....	6
1. Einleitung.....	7
1.1 Die chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose (CRVVC) .....	7
1.2 Aufgabenstellung.....	10
2. Bedeutung der sekretorischen Aspartatproteinasen (SAP) .....	11
2.1 Klassifikation .....	11
2.2 Genetik .....	11
2.3 Funktion und Eigenschaften .....	12
2.4 Expression von SAP in-vitro und in-vivo.....	13
2.5 Zusammenfassung .....	17
3. Eigene Untersuchungen .....	18
3.1 Vorbemerkung .....	18
3.2 Patientgut .....	18
3.3 Probenentnahme .....	19
3.3.1 Abstrich .....	19
3.4 Anamnese .....	19
3.5 Kulturelle Diagnostik.....	20
3.5.1 Sabouraud-Agar .....	20
3.5.2 Chrom-Agar .....	21
3.6 Präparation der Candida-RNA aus Vaginalabstrichen und cDNA-Synthese ....	22
3.6.2 DNase-Reaktion .....	24
3.6.3 reverse Transkriptase Reaktion (rT-Reaktion ) und cDNA-Synthese .....	24
3.7 PCR-Untersuchungen .....	26
3.7.1 Primer .....	26
3.7.2 Elongationsfaktor (Primer EFB)- Erläuterung.....	27
3.7.3 Vorversuche .....	28
3.7.4 Herstellung einer Positiv-Kontrolle .....	28
3.8 Erstellung des PCR-Programms sowie Erstellung des Reaktionsansatzes (Mastermix) .....	30
3.9 Detektion der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese .....	32
4. Ergebnisse .....	34
4.1 Statistische Methoden .....	34
4.2 Anamnese .....	34
4.3 Mikrobiologische Untersuchungen .....	35
4.4 Molekularbiologische Untersuchungen.....	36
4.4.1 Allgemeine Ergebnisse Candida-Gruppe .....	36
4.4.2 Spezielle Ergebnisse in der Candida-Gruppe: SAP-Expression .....	37
4.4.3 Allgemeine Ergebnisse in der Kontrollgruppe .....	38
4.4.4 Spezielle Ergebnisse in der Kontrollgruppe: SAP-Expression .....	39
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	40
5. Diskussion .....	43
6. Zusammenfassung .....	48

7. Literaturverzeichnis .....	50
8. Geräte und Material.....	55
9. Patientendaten .....	58
9.1 Candidagruppe: Kulturelle und molekularbiologische Daten sowie anamnestische Daten.....	58
9.2 Kontrollgruppe: Kulturelle und molekularbiologische Daten sowie anamnestische Daten.....	65
10. Danksagung .....	69
11. Lebenslauf.....	70

## 0. Abkürzungen

Aqua a.i.	Aqua ad iniectabilia
bp	Basenpaare
cDNA	copy-DNA
CRVVC	Chronisch rezidivierende Vulvovaginal- candidose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
mM	milli Mol
mRNA	Messenger-RNA
NTP (ATP, CTP, GTP, TTP)	Nukleosidtriphosphate (Adenosin-, Cytidin-,Guanosin, Thymidin- triphosphat)
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.i.	post infectionem
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rT	reverse Transkriptase
SAP	Sekretorische Aspartatproteinasen
SAB-Agar	Sabouraud-Agarplatte

## 1. Einleitung

In Deutschland erkranken etwa fünf Millionen Frauen pro Jahr an einer genitalen Candidainfektion. Besondere Probleme bereitet hierbei die chronisch-rezidivierende Form der Genitalcandidose mit mindestens vier Attacken pro Jahr. Jährlich werden etwa 4000 Frauen in der infektiologischen Spezialsprechstunde der Universitäts-Frauenklinik München-Großhadern mit diesem Krankheitsbild behandelt [44].

### 1.1 Die chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose (CRVVC)

Die CRVVC ist eine Erkrankung, die schwierig zu diagnostizieren und vor allem zu behandeln ist [42][22]. Das Vorkommen der vaginalen Candidose ist altersabhängig. Episoden einer Pilzinfektion vor Beginn der Pubertät sind jedoch selten. Am häufigsten sind Frauen gegen Ende der zweiten sowie in der dritten und vierten Lebensdekade betroffen [38][45].

Eine Candidose kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden: begünstigend wirken sich beispielsweise Endokrinopathien [38], Diabetes mellitus, Antibiotikatherapien, Zytostatika, Steroide oder eine Schwangerschaft [10] auf ein Candida-Wachstum in der Scheide aus. Auch ein Zusammenhang mit Allergien ist denkbar; so konnte beispielsweise bei Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom in 87 Prozent eine chronische Candidainfektion der Schleimhäute nachgewiesen werden [10].

Als wesentliche Belästigung einer Vulvovaginalcandidose wird häufig ein prämenstruell beginnender Juckreiz im Introitusbereich angegeben. Weitere häufige Symptome sind Brennen, Dysurie, Fluor, und Dyspareunie [45]. Die klinischen Symptome sind jedoch nicht einheitlich und variieren von Frau zu Frau. Frauen die an einer rezidivierenden Vulvovaginalcandidose erkrankt sind, können trotz Meidung auslösender Faktoren erneut erkranken. Eine Therapie kann zwar auf die momentane Symptomatik ansprechen, aber erneute Attacken nicht verhindern. So erkranken im Durchschnitt 50 % der Frauen etwa drei Monate nach erfolgreicher Behandlung wieder an einer Vulvovaginalcandidose [9].

Die Genese dieser Erkrankung ist wahrscheinlich multifaktoriell: der Wirtsorganismus selbst sowie *Candida albicans* dürften eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der CRVVC spielen. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine wiederholte Infektion der Vagina mit *Candida albicans* aus dem Urogenital- oder Gastrointestinaltrakt, oder um einen Rückfall einer nicht ausgeheilten Candidainfektion. Auch eine sexuelle Übertragung ist denkbar [9][42] (Tabelle 1.1-1).

Tabelle 1.1-1. Mögliche Faktoren in der Pathogenese von Candidosen [9][42].

Reinfektion	Gastrointestinaltrakt Rektal → Vaginal Urogenitaltrakt Sexuelle Übertragung durch Infizierten Partner
Rückfall	Virulenzmechanismen des Organismus; Antimykotische Resistenzen
Pilzspezif. Faktoren	Dimorphismus Phänotypischer Wechsel Enzymsekretion
Körpereigene Störungen	Nicht-immunologisch: z.B. Veränderungen in der bakteriellen Mikroflora, hormonelle Veränderungen  Immunologisch: Allergien, zellvermittelte Immunität
exogene Faktoren	Medikamenteneinnahmen

Auch Veränderungen im hormonellen Bereich können für eine Candidose prädisponieren. So kann bei Gebrauch von Kontrazeptiva oder Hormontabletten mit hohem Östrogenanteil eine erhöhte Inzidenz einer Candidose beobachtet werden. Auch bei Schwangeren ist dieses Risiko erhöht. Möglicherweise hängt dies damit zusammen, daß es bei hohen Östrogenspiegeln zu einer reduzierten Antikörpersekretion (vor allem IgG und IgA) in die Vaginalflüssigkeit kommt. Außerdem gibt es Hinweise dafür, daß Östrogene vaginale Epithelzellen für *Candida albicans* besonders „attraktiv“ machen [9]. Unter anderem kann durch Östrogene eine myceliale Wachstumsform induziert werden [46]. Auch Progesteron scheint bei der Entwicklung einer Candidose eine Rolle zu spielen: So konnte Kalo-Klein et al. [20] nachweisen, daß Progesteron eine Reduktion von candidaspezifischen Lymphocyten um 50 % bewirkt.

Die durch *Candida albicans* induzierten Eingriffe in das Immunsystem sind vielfältig:

So kommt es sowohl zur Aktivierung der zellvermittelten Immunität als auch zur



Aktivierung der humoralen Immunantwort. De Carvalho et al [7] konnten beispielsweise eine erhöhte Antikörpersekretion (IgA, IgG) bei Frauen mit einer symptomatischen Candidose in Vaginalabstrichen finden. Über die zellvermittelte Immunität kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Cytokinen. Weissenbacher et al (2001) konnten beispielsweise eine erhöhte Interleukin-Produktion bei Frauen mit CRVVC nachweisen. Auch Prostaglandine haben eine immunmodulatorische Wirkung. So beschrieben Noverr et al [29], dass Prostaglandine sowohl von Wirtszellen sezerniert werden als auch *Candida albicans* selbst Prostaglandine sezernieren kann. Bei Anwesenheit von Prostaglandinen konnte eine verstärkte Umwandlung von Hefe- zu Hyphenform beobachtet werden. Auch kam es zu einer verstärkten Produktion von Interleukin-10. Interleukin-10 gilt unter anderem als ein antiinflammatorisches Zytokin (Tabelle 1.1-2).

Nicht nur das Immunsystem wird von Hormonen beeinflusst, sondern auch die Zusammensetzung der vaginalen Mikroflora. Diese wiederum hat Auswirkungen auf die Kolonisierungsmöglichkeiten von Pilzen. So kann eine intakte bakterielle Flora *Candida albicans* die nötigen Nährstoffe entziehen oder durch Sekretion von Toxinen im Wachstum hemmen (siehe Tabelle 1.1-2). Besondere Bedeutung kommt hierbei den Lactobazillen zu: Sie besitzen unter anderem die Fähigkeit ein hyphales Wachstum der Pilze zu verhindern [9][37].

Die genaue Ätiologie der CRVVC ist letztlich unklar. Sicher scheint nur zu sein, daß hier nicht ein Mechanismus verantwortlich ist, sondern ein komplexes Zusammenspiel von vielen verschiedenen Faktoren (Tabelle 1.1-3)

---

Tabelle 1.1-2. Eingriffe in das Immunsystem durch *Candida albicans* [9][10].

---

- Aktivierung der zellvermittelten Immunität
- Aktivierung der humoralen Immunantwort (IgA, IgG, IgE)
- Stimulierung der Cytokinproduktion
- Stimulierung der Prostaglandinsekretion (begünstigt unter anderem den Übergang von der Hefe- zur Hyphenform)

Tabelle 1.1-3. Mögliche Ursachen einer CRVVC.

Erkrankungen	Therapiemaßnahmen	Pilzspezifische Faktoren	Re-Infektion / Rückfall	Risiko-Personengruppen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immundefekte</li> <li>• Granulocytopenien</li> <li>• Hämatologische Erkrankungen</li> <li>• Malignome</li> <li>• Diabetes mellitus</li> <li>• Endokrinopathien</li> <li>• Niereninsuffizienz</li> <li>• HIV-Infektion</li> <li>• Allergien</li> <li>• schwere Allgemeinerkrankungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytostatika</li> <li>• Immunsuppressiva</li> <li>• Corticosteroide</li> <li>• Strahlentherapie</li> <li>• Intensivtherapie</li> <li>• Kontrazeptiva</li> <li>• Hormontabletten</li> <li>• Langzeitbehandlung mit Antibiotika</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimorphismus</li> <li>• Phänotypischer Wechsel</li> <li>• Proteasen, Lipasen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gastrointestinaltrakt/ Urogenitaltrakt → Vaginal</li> <li>• infizierter Partner</li> <li>• antimykotische Resistenzen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwangere</li> <li>• Frühgeborene</li> <li>• Menschen mit vernachlässigter Körperhygiene</li> </ul>

## 1.2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll ein Pathogenitätsfaktor von *Candida albicans* genauer betrachtet werden: die Gruppe der hydrolytischen Enzyme und hiervon die sekretorischen Aspartat Proteinasen (SAP). Diese sollen bei Patientinnen mit einer CRVVC im Vaginalsekret und einer entsprechenden mit *Candida albicans* kolonisierten und asymptomatischen Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Hierzu erfolgt zunächst bei jeder Patientin die Erhebung einer Anamnese sowie eine kulturelle Pilzdiagnostik. Die SAP sollen dann im Vaginalsekret durch reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (rT-PCR) und Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden.

## 2. Bedeutung der sekretorischen Aspartatproteinasen (SAP)

### 2.1 Klassifikation

1965 wird erstmalig eine extrazelluläre proteolytische Aktivität bei *Candida albicans* beschrieben und als ein möglicher Pathogenitätsfaktor diskutiert [39][40]. Durch den Begriff „sekretorische Aspartatprotease“ kommen zwei wichtige Eigenschaften dieser Enzyme zum Ausdruck: einerseits der extrazelluläre Wirkungsbereich und andererseits die Zugehörigkeit zur Klasse der Aspartat-Proteinasen. Insgesamt wird in vier verschiedene Proteinase-Klassen unterschieden:

1. Serin-Proteinasen (z.B. Trypsin, Chymotrypsin),
2. Cystein-Proteinasen (z.B. Papain),
3. Metallo-Proteinasen (z.B. Kollagenasen),
4. Aspartat-Proteinasen (z.B. Pepsin, Renin, hierzu zählen auch die **HIV-Proteinasen**).

Im Gegensatz zu den anderen Proteinasegruppen, können Aspartatproteinasen in vitro durch Pepstatin gehemmt werden [8][11][16][17].

### 2.2 Genetik

Bis heute konnten bei *Candida albicans* zehn verschiedene Gene die für sekretorische Aspartat Proteinasen codieren identifiziert werden [35]. Hierbei lassen sich zwei relativ eng verwandte Gruppen (SAP 1-3 und SAP 4-6) und drei weniger homologe Gene (SAP7, SAP 8, SAP 9) unterscheiden. Alle SAP-Gene codieren eine Signalsequenz, ein Präpropeptid, sowie ein Hauptprotein [16][25][18].

Die Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert: So konnten SAP 1, SAP 2, SAP 4, SAP 5 und SAP 6 Chromosom 6, SAP 3 Chromosom 3 und SAP 7 Chromosom 1 zugeordnet werden [25] (Tabelle 2.2-1).

Tabelle 2.2-1. Lokalisation der SAP auf den Chromosomen [25].

- Chromosom 1: SAP 7
- Chromosom 3: SAP 3
- Chromosom 6: SAP 1, SAP 2, SAP 4, SAP 5, SAP 6

### 2.3 Funktion und Eigenschaften

Verschiedene Funktionen von Proteinasen bei einer Infektion mit *Candida albicans* sind denkbar:

1. unterstützende Wirkung beim Eindringen in das Wirtsgewebe
2. Hydrolyse von Oberflächenproteinen, um eine verstärkte Adhäsion zu erreichen
3. Zerstörung von Komponenten des humanen Immunsystems
4. Versorgung der *Candida*-Zellen mit stickstoffhaltigen Moleküle
5. Aktivierung von proteolytischen Kaskaden des Wirtes [28][18].

Tabelle 2.3-1. Mögliche Funktionen von sekretorischen Aspartat Proteinasen bei Candidosen [15][17][18][28].

Funktion	Zielproteine
Schädigung von Proteinen des Immunsystems	IgG, IgA, sIgA $\alpha$ -Makroglobulin Cathepsin D Laktoferrin Laktoperoxidase Makrophagenenzyme
Zerstörung von Wirtszellen	Keratin
Vorbereitung der Invasion	Kollagen
Adhäsion	Oberflächenproteine
Aktivierung von Kaskade-Systemen	Kallikrein-Kinin System Blutgerinnungskaskade

Zu den möglichen Substraten der SAP zählen zahlreiche Proteine des Wirtsorganismus. So können Schutzproteine von Schleimhäuten wie Laktoferrin, Laktoperoxidase oder Mucine inaktiviert werden. Aber auch

Immunglobuline (IgA, IgG und IgM), Kollagen, Keratin, Proteinaseinhibitoren, Makrophagenenzyme, Proteine der Blutgerinnungskaskade, das Kallikrein-Kinin-System und Cytokine können von den SAP inaktiviert werden [15][17] (Tabelle 2.3-1). Gemeinsam ist SAP 1, Sap 2, SAP 3 und SAP 6 die Fähigkeit Peptidbindungen zwischen hydrophoben und positiv geladenen Aminosäuren spalten zu können, dies gilt insbesondere für SAP 2 und SAP 3 [21].

Aktiv sind SAP in einem sauren Milieu. In vitro variiert das pH-Optimum zwischen 2,2 und 3,3. Die Proteasen SAP 1, SAP 2 und SAP 3 sind vor allem im sauren Milieu bei einem pH-Wert von 2,2 – 2,3 aktiv. Bei einer Verschiebung des pH-Wertes über 8,4 kommt es zu einer irreversiblen Denaturierung der Enzyme. Hingegen sind SAP 4, Sap 5 und Sap 6 besonders bei neutralem pH-Wert aktiv [11][47] (Tabelle 2.3-2).

Tabelle 2.3-2. Enzymexpression in Abhängigkeit des pH-Wertes [11][47].

pH-Wert 2.2 –2.3	pH-Wert 7.0	pH-Wert > 8.4
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 1</li> <li>• SAP 2</li> <li>• SAP 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 4</li> <li>• SAP 5</li> <li>• SAP 6</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• irreversible Denaturierung der SAP</li> </ul>

### 2.4 Expression von SAP in-vitro und in-vivo

Bedeutend für die Virulenz von *Candida albicans* ist unter anderem seine Fähigkeit den Phänotyp zu ändern sowie sein Dimorphismus. Diese Mechanismen korrelieren mit einer unterschiedlichen SAP-Genaktivierung und nachfolgender Enzymexpression. So konnte in in-vitro Studien bei einem „phänotypischen switch“ die Expression von SAP 1, SAP 2 und SAP 3 beobachtet werden. Auch der Wechsel von Hefe- zu Hyphenform<sup>1</sup> geht mit einer bestimmten SAP-Expression einher: SAP 4, SAP 5 und SAP 6 [13][15] (Tabelle 2.4-1).

<sup>1</sup> Die Hyphenform wirkt sich begünstigend auf das Fortschreiten einer Infektion aus, da Hyphen die Tendenz haben, sich entlang vorgegebener Strukturen wie z.B. Zellgrenzen auszubreiten (sogenannter Thigmotropismus) [10].

Tabelle 2.4-1. In-Vitro SAP-Expression in Abhängigkeit des Phänotyps bei neutralem pH-Wert [13][15].

Phänotypischer Wechsel	Hyphenform
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 1</li> <li>• SAP 2</li> <li>• SAP 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 4</li> <li>• SAP 5</li> <li>• SAP 6</li> </ul>

Unter Kulturbedingungen bei denen Stickstoff der einzige Nährstoff ist, dominiert das Isoenzym SAP 2. Denkbar wäre hier eine Funktion für das Pilzwachstum. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung verstärkt, daß Mutanten die kein SAP 2 exprimieren können, auf solchen Nährmedien schlechter wachsen. Ähnliches läßt sich aber auch bei SAP 1 bzw. SAP 3 Mutanten beobachten [14]. Ferner besitzt SAP 2 die Fähigkeit an einer Schädigung von Endothelzellen mitzuwirken und diese zur Bildung bzw. Sekretion von Adhäsionsmolekülen anzuregen. Hierzu gehören beispielsweise E-Selectin, ICAM-1 oder ICAM-2 (interzelluläre Adhäsionsmoleküle) [19].

In vitro Untersuchungen bezüglich der Expression von SAP 8 und SAP 9 führten zu folgender Feststellung: SAP 8 wird von Hefen bei 25 °C nach sechs bis neun stündigem Wachstum in BSA-haltigem<sup>2</sup> Medium sezerniert, zudem soll die Expression von SAP 8 temperaturabhängig sein [18]. SAP 9 findet sich erst in späteren Wachstumsphasen, wenn die Aktivität von SAP 8 nachläßt [24].

Das SAP-Expressionsmuster ist außerdem abhängig vom Fortschreiten der Infektion. So werden einige SAPs unmittelbar nach Kontakt mit dem Wirtsgewebe aktiviert, während andere SAPs erst dann aktiv werden, wenn der Pilz in tiefere Gewebeschichten vorgedrungen ist. Hier entscheidet auch die Anzahl der eingedrungenen Pilzzellen, ob weitere SAPs für eine erfolgreiche Infektion benötigt werden oder nicht [41]. So konnte an einem in vitro Modell für kutane Candidose folgende Aktivierung von SAP beobachtet werden: Expression von SAP 1 und 2 in den obersten Zellschichten, SAP 8 beim Eindringen ins Stratum corneum und SAP 6 in tiefen Schichten (Stratum granulosum, spinosum und basale). Das Auftreten von SAP 6 war im

<sup>2</sup> BSA-Medium, Sigma

mikroskopischen Bild außerdem assoziiert mit Keimschläuchen und Hyphen [35] (Tabelle 2.4-2).

Tabelle 2.4-2. Expression der SAP in Abhängigkeit von der Eindringtiefe [35].

oberste Hautschicht	tiefere Hautschichten
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 1</li> <li>• SAP 2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 8</li> <li>• SAP 6</li> </ul>

Eine erhöhte SAP-Expression konnte auch nachgewiesen werden, nachdem *Candida albicans* Zellen von Makrophagen phagozytiert worden waren. Hier konnte eine hohe Produktion von SAP 4, SAP 5 und SAP 6 beobachtet werden [5].

An einem in vitro Modell für orale Candidose untersuchten Schaller et al. [36] mittels rT-PCR die zeitliche Abfolge der SAP-Expression. Hier konnten 42 Stunden nach Infektion durch *Candida albicans* SAP 1 und SAP 3 nachgewiesen werden. Mikroskopisch ging dies mit Ödembildung und Schädigung oberflächlicher Hautschichten einher. Nach 48 Stunden wurde SAP 6 exprimiert; im mikroskopischen Bild konnte eine schwere Schädigung des Epithels beobachtet werden, sowie das Auftreten von Keimschläuchen. Erst 60 Stunden nach Infektion konnten SAP 2 und SAP 8 nachgewiesen werden. SAP 4 und SAP 5 wurden nicht exprimiert (Tabelle 2.4-3).

Tabelle 2.4-3. Zeitliches Expressionsmuster der SAP bei pH 7.0 – 7.4 [36].

42 h p.i.	48 h p.i.	60 h p.i.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 1</li> <li>• SAP 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 1</li> <li>• SAP 3</li> <li>• SAP 6</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 1</li> <li>• SAP 3</li> <li>• SAP 6</li> <li>• SAP 2</li> <li>• SAP 8</li> </ul>

In einer vergleichenden Untersuchung wurde zudem die SAP-Expression bei zwei Patienten mit oraler Candidose und unterschiedlicher Krankheitsdauer untersucht [36]. Hier wurde folgende Enzymexpression festgestellt:

Patient A:

symptomatisch seit einigen Tagen

- SAP 1
- SAP 3
- SAP 6

Patient B:

symptomatisch seit einem Jahr

- SAP 1
- SAP 2
- SAP 3
- SAP 6

Naglik et al. [26] untersuchten zehn Patienten mit oraler Candidose im Vergleich zu acht asymptomatischen Candidaträgern bezüglich der SAP-Expression. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl bei den asymptomatischen wie bei den symptomatischen Patienten SAP 2, SAP 4, SAP 5 und SAP 6 die dominierenden Genprodukte sind. SAP 1 und SAP 3 konnten nur bei den Patienten mit oraler Candidose nachgewiesen werden. Auch konnte bei einem Vergleich von symptomatischen und asymptomatischen Patienten mit oraler Candidose eine achtmal höhere Proteinase-Produktion als bei der asymptomatischen Kontrollgruppe festgestellt werden [4].

Bernardis et al. [3] stellten bei Untersuchungen an einer mit *Candida albicans* infizierten Rattenvagina folgende zeitliche Reihenfolge der SAP-Expression fest: SAP 2, SAP 1, SAP 3. Bei einem Fehlen des SAP-2-Gens kam es im Rattenversuch nur zu einer geringen Schädigung der Vagina. Dieser Effekt wurde auch bei SAP 1 und SAP 3 beobachtet, die schädigende Wirkung war hier jedoch geringer ausgeprägt.

Auch in Studien bei denen einzelne SAP nicht mehr funktionsfähig waren, konnte die Bedeutung der SAP als Virulenzfaktor nachgewiesen werden: So wurden Untersuchungen mit Mutanten durchgeführt, bei denen die Gene SAP 1-3 bzw. SAP 4-6 nicht funktionsfähig waren. Dadurch kam es bei mit *Candida*



albicans inokulierten Versuchstieren zu erhöhten Überlebensraten [14] [32].

## 2.5 Zusammenfassung

In verschiedenen Studien wurde die Bedeutung der SAP als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor für *Candida albicans* nachgewiesen. *Candida albicans* kann sich durch eine unterschiedliche Kombination seiner SAP verschiedene Wirtsnischen erschließen. Welche Enzyme letztlich exprimiert werden ist von mehreren Faktoren wie Typ der Infektion (systemisch oder lokal), Ort der Infektion (Epidermis, Schleimhaut), pH-Wert, Temperatur, Fortschritt der Infektion (oberflächlich oder tief) oder dem Phänotyp abhängig (Tabelle 2.3-2; Tabelle 2.5-1).

Tabelle 2.5-1. SAP-Expression in Abhängigkeit vom Infektionsort [3][26][36].

Ösophagus	Rattenvagina	orale Candidose	
		symptomatisch	asymptomatisch
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 5</li> <li>• SAP 6</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 2</li> <li>• SAP 1</li> <li>• SAP 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 2</li> <li>• SAP 4</li> <li>• SAP 5</li> <li>• SAP 6</li> <li>• SAP 1</li> <li>• SAP 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SAP 2</li> <li>• SAP 4</li> <li>• SAP 5</li> <li>• SAP 6</li> </ul>

### **3. Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Vorbemerkung**

Da es aufgrund der zahlreichen Arbeitsschritte angefangen von der Probenentnahme, über RNA-Synthese, DNase-Reaktion, rT-Reaktion / cDNA-Synthese und den abschließenden PCRs zahlreiche Fehlermöglichkeiten gibt, war ein sauberes und präzises Arbeiten unumgänglich. Um mit den einzelnen Schritten vertraut zu werden, erfolgten mehrere „Trockenübungen“ mit den einzelnen Reaktionsschritten. Hier konnte mit Reaktionsansätzen und Inkubationszeiten experimentiert werden, um für die spätere Verarbeitung der Patientenproben optimale Versuchsbedingungen zu erhalten. Auch waren mehrere Versuche notwendig um eine bestmögliche Probengewinnung zu erzielen. So erwies sich beispielsweise eine Probenentnahme mit einem herkömmlichen Wattetupfer als problematisch, da in den darauffolgenden PCRs keine Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden konnten. Eine gute Ausbeute an RNA - was entscheidend für die spätere Synthese von cDNA und die nachfolgenden PCRs ist - ließ sich schließlich mit dem Einsatz von RNAlater erzielen. Zudem konnten die so vorliegenden Patientenproben problemlos für längere Zeit (bei 4° C mindestens 1 Monat) gelagert werden, so dass nach Probenentnahme nicht eine sofortige Weiterverarbeitung erfolgen musste. Zudem erfolgten sämtliche Arbeitsschritte an einem sterilen Arbeitsplatz um einer möglichen Kontamination bei der Probenbearbeitung entgegenzuwirken.

#### **3.2 Patientgut**

Im Rahmen der mikrobiologischen Sprechstunde des Klinikums Großhadern wurden insgesamt 135 Patientinnen untersucht. Hiervon konnten 95 Patientinnen mit mindestens vier pro Jahr auftretenden Episoden einer Vulvovaginalcandidose der Candidagruppe und 40 asymptomatische, jedoch mit *Candida albicans* kolonisierte Patientinnen der Kontrollgruppe zugeordnet werden. Das Durchschnittsalter der Candidosepatientinnen betrug 36,0 Jahre , das der Kontrollgruppe 38,4 Jahre.

#### 3.3 Probenentnahme

##### 3.3.1 Abstrich

Sowohl für die mikrobiologische Diagnostik als auch für die molekularbiologische Diagnostik werden Vaginalabstriche benötigt. Für die mikrobiologische Diagnostik erfolgte die Probenentnahme aus dem hinteren Scheidengewölbe mittels sterilen Watteträgern. Für die molekularbiologische Diagnostik wurden 2 ml 0.9 % physiologische Kochsalzlösung mit einer 3 ml Spritze in die Vagina eingebracht, mit einem zweiten Wattetupfer kurz durchmengt und wieder mit derselben Spritze aufgenommen. Anschließend wird die Suspension sofort in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit RNA-later eingebracht. RNAlater ist eine speziell für die Isolierung von RNA hergestellte Lösung. Diese soll gewährleisten, dass in dem zu untersuchendem Material keine weiteren Enzymsynthesen ablaufen können. Dadurch können die zum Zeitpunkt der Probenentnahme „aktiven“ Enzyme bestimmt werden. RNAlater dringt in das isolierte Gewebe ein und stabilisiert die RNA. Ein „Schockgefrieren“ der Proben mit flüssigem Stickstoff ist dadurch nicht mehr nötig.

In vergleichenden Untersuchungen mit flüssigem Stickstoff und RNAlater konnten wir weder eine Ergebnisverschlechterung noch eine Ergebnisverbesserung feststellen, so dass wir aus Gründen der Praktikabilität RNAlater verwendeten.

#### 3.4 Anamnese

Bei jeder Patientin wurde zudem eine kurze Anamnese erhoben. Von Interesse waren:

1. Kontrazeption
2. Geburten
3. Aborte
4. Allergien

Eine Verschlüsselung der so erhaltenen Daten erfolgte nach folgendem Schema:

Kontrazeption	Geburten	Abort	Allergie
0 = keine	0 = keine	0 = kein	0 = nein
1 = hormonell	1 = 1	1 = mind.1	1 = ja
2 = nicht-hormonell	2 = 2-3		
	3 = >3		

Eine detaillierte Unterteilung des Beschwerdebildes unterblieb, da der Großteil der Symptome aus einer Kombination von Juckreiz, Brennen oder Fluor bestand. Bei der Kontrazeption wurde lediglich in hormonelle und nicht-hormonellen Methoden unterschieden. Von Interesse war zusätzlich die Anzahl der Geburten bzw. Aborte sowie das Vorliegen von Allergien.

### 3.5 Kulturelle Diagnostik

#### 3.5.1 Sabouraud-Agar

Auf einer Sabouraud Agarplatte bzw. in Sabouraud-Bouillon soll ein mögliches Pilzwachstum zunächst objektiviert werden und dann auf einer Chrom-Agar-Platte genauer differenziert werden.

Der Watteträger wird auf Sabouraud-Agar ausgestrichen und danach sofort in einer Sabouraud-Bouillon ausgeschwenkt. Auf Grund einer zu geringen Keimzahl kann ein Wachstum auf der Agarplatte zunächst ausbleiben. Aus diesem Grund bringt man den Wattetupfer zusätzlich in ein flüssiges Nährmedium ein, da dadurch eine größere Keimvermehrung erzielt werden kann. In einer kürzlich erschienen Studie konnte gezeigt werden, dass in der Sabouraud-Bouillon 26 % mehr Hefen nachgewiesen werden als auf der Platte [30]. Die Sensitivität der kulturellen Diagnostik lässt sich dadurch erhöhen.

Um eine sekundäre Verunreinigung sowie eine Austrocknung des Nährmediums zu vermeiden, werden die Agarplatten mit einem Klebestreifen verschlossen. Die Bebrütung sowohl der Agarplatten als auch der Bouillon erfolgt bei 37 ° C in einem Brutschrank. Innerhalb von zwei bis drei Tagen lässt sich das Ergebnis von den Agarplatten ablesen. Die Kulturen wachsen meist als

elfenbeinfarbene, glatte Kolonie. Beim Öffnen einer Platte ist häufig ein hefeartiger Geruch auffällig.

Sollte zwei bis drei Tage nach Beimpfung der Platte kein Wachstum stattgefunden haben, erfolgt eine erneute Beimpfung einer SAB-Agarplatte aus der Bouillon. Ist auf der Platte nach weiteren zwei bis drei Tagen keine Pilzkultur gewachsen, wird sie als Kultur-negativ gewertet.

#### 3.5.2 Chrom-Agar

Da eine Differenzierung der einzelnen Candida-Spezies mittels Sabouraud-Agar nicht möglich ist, erfolgt die genauere Bestimmung der Candida-Spezies mittels Chrom-Agar. Hier können vier Candida species differenziert werden: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. glabrata*.

Mit einer sterilen Öse werden einige Kulturen von einer positiven Sabouraud-Agarplatte abgenommen und auf Chrom-Agar ausgestrichen. Die Chrom-Agarplatte wird ebenfalls für zwei bis drei Tage bei 37 ° C bebrütet. Durch Zusatz von speziellen Stoffen im Nährboden kann auf Grund unterschiedlicher Farbreaktionen eine genaue Speziesbestimmung vorgenommen werden [12] [31]: So färbt sich *Candida albicans* grün, *C. glabrata* rosa, *C. tropicalis* blau und *C. krusei* hellrosa (Abbildung 3.5.2-1).

---

Abbildung 3.5.2-1. Differenzierung der Candidaspezies auf Chromagar: *Candida albicans* grün, *Candida glabrata* rosa, *Candida tropicalis* blau und *Candida krusei* hellrosa [44].

---



### **3.6 Präparation der Candida-RNA aus Vaginalabstrichen und cDNA-Synthese**

#### **3.6.1 RNA-Isolierung**

Von entscheidender Bedeutung für die spätere Synthese von cDNA ist eine optimale Isolierung der RNA, da von der Qualität der RNA die spätere Ausbeute an cDNA abhängig ist.

Die RNA-Isolierung erfolgt auf Basis der Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode mit peqGOLD RNAPure™ nach Anleitung des Herstellers.

Die Isolierung der RNA erfolgt in fünf Schritten:

1. Homogenisierung
2. Phasentrennung
3. RNA-Präzipitation
4. Waschen der RNA
5. Lösen der RNA.

#### **1. Homogenisierung.**

---

Die in RNA-later konservierte Patientenprobe wird für 10 Minuten bei 5000 rpm (rounds per minute) zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wird in 1 ml peqGold resuspendiert und 0.5 g Glaskügelchen zugegeben. Nach 20 minütigem mixen kommt es zu einem Aufbrechen der Zellen und zur Freisetzung von DNA und RNA.

#### **2. Phasentrennung.**

---

Die Proben werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um eine Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Dann werden 0.2 ml Chloroform zugegeben und die Proben für 15 sec kräftig geschüttelt. Anschließend werden sie 7 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 12.000 rpm führt dann zu einer Trennung in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine dazwischenliegende Interphase und eine obere, farblose, wässrige Phase. In der Phenol- und

Interphase befinden sich DNA und Proteine, während sich die RNA ausschließlich in der oberen, wässrigen Schicht anreichert. Die wässrige Schicht nimmt dabei ca 60 % des Probenvolumens ein (Abbildung 3.6.1-1).

---

Abbildung 3.6.1-1. **Phasentrennung.** Die oberste Schicht (hier weiß dargestellt) enthält die RNA. Hellgrau dargestellt die Interphase mit DNA und Proteinen. Gelb dargestellt ist die Phenol-Chloroform-Phase.

---



### 3. RNA-Präzipitation.

---

Die wässrige Schicht wird abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgt mit 0.5 ml Isopropanol: die Proben werden für 7 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Jetzt ist am Boden des Reaktionsgefäß ein gelartiges RNA-Präzipitat sichtbar.

### 4. Waschen der RNA

---

Der Isopropanolüberstand wird abgezogen und das Pellet zweimal mit 75 % Ethanol jeweils durch Mischen und anschließender Zentrifugation bei 12.000 rpm für 10 Minuten gewaschen.

## 5. Lösen der RNA

---

Um beim Lösen der RNA eine Denaturierung der RNA durch RNAsen zu vermeiden, wird bereits jetzt RNaseOut hinzupipetiert. Hier handelt es sich um ein Enzym, das den vorzeitigen Abbau der RNA verhindern soll.

Der Ethanol-Überstand wird abgegossen und das Pellet für 2 Minuten luftgetrocknet. Die RNA wird in 22 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 1 µl RNase-Out resuspendiert. Im Reaktionsgefäß befindet sich jetzt die Gesamt-RNA einschließlich mRNA und rRNA.

### 3.6.2 DNase-Reaktion

Um sicherzustellen, daß sich in der RNA-Lösung keine kontaminierende DNA mehr befindet, wird ein DNase-Schritt durchgeführt. Dieses Enzym zerstört noch vorliegende DNA.

In ein neues Reaktionsgefäß werden

- 3 µl 10X DNase I Reaction Buffer,
- 3 µl DNase I Amp Grade,
- 1 µl RNase-Out,
- 3µl DEPC-H<sub>2</sub>O und
- 21 µl RNA-Lösung pipettiert.

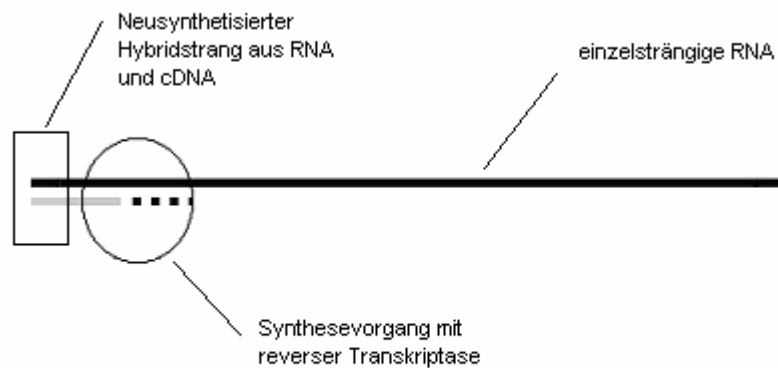
Die Probe wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Danach wird die DNase durch Zugabe von 3 µl EDTA und Erhitzen für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Die gereinigte RNA kann nun mittels rT-Reaktion in cDNA umgeschrieben werden.

### 3.6.3 reverse Transkriptase Reaktion (rT-Reaktion ) und cDNA-Synthese

Hier kommt es zur Umschreibung der einzelsträngigen RNA in eine doppelsträngige cDNA (Abbildung 3.6.3-1).



Abbildung 3.6.3-1. Reverse-Transkriptase Reaktion.



Pro Patientenprobe werden 2 Reaktionsgefäße benötigt: ein Reaktionsgefäß A für die Patientenprobe, ein Reaktionsgefäß B für die negativ-Kontrolle.

1. In jedes der Reaktionsgefäße werden nach folgendem Schema RNA, NTPs, Primer und Wasser pipettiert :

	Reaktionsgefäß A	Reaktionsgefäß B
RNA-Lösung	5 µl	-
10 mM dNTP mix	1 µl	1 µl
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> (0.5 µg/µl)	1 µl	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	3 µl	3 µl

2. Jede Probe wird für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend 1 Minute auf Eis gekühlt.

3. Der Reaktionsmix wird nach folgendem Schema angesetzt:

10X RT buffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNASEOUT Recombinant RNase Inhibitor.	1 µl

4. In jedes der Reaktionsgefäße A-C werden 9 µl des Reaktionsmix zugegeben, durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Pipette gemischt und für 10 sec bei 2000 rpm zentrifugiert.

5. Inkubation der Reaktionsgefäße für 2 Minuten bei 42 °C.

6. In jedes Reaktionsgefäß werden 1 µl (50 units) Superscript II RT pipettiert, kurz gemischt und für 50 Minuten bei 42° C inkubiert, abschließend noch für 15 Minuten auf 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt.

7. Danach werden die Proben 10 sec bei 2000 rpm zentrifugiert und in jedes Reaktionsgefäß 1 µl RNase H hinzupipettiert und für 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Durch Zugabe von RNase H wird die Sensitivität der nachfolgenden PCR erhöht. RNase H entfernt die in dem cDNA:RNA-Hybrid vorliegende RNA.

Die jetzt vorliegende cDNA kann nun in einer PCR amplifiziert werden.

### 3.7 PCR-Untersuchungen

#### 3.7.1 Primer

Die Primer lagen in pulverisierter Form mit unterschiedlichen Molekulargewichten vor. Deshalb pipettierten wir Aqua a.i. entsprechend dem Molekulargewicht zu den Primern. Betrug beispielsweise das Molekulargewicht 7106 µg/µmol so pipettierten wir 7106 µl Wasser hinzu.

Für die Amplifizierung der Gene SAP 1- EFB1 verwendeten wir folgende Primer-Paare [36]:

SAP 1	AGG GAA AGG TAT TTA CAC T
	GAT TTG CTT ACA TAG TAA GTA C

SAP 2	CTT AGG TCA AGG CAG AAA TAC TG CCT AAA GCA TTC CCA GGT TAC
SAP 3	TGG ATT GGA ACA TTT CTA ATT C CAA TCT CCA GAG GAG TAC TTC C
SAP 4	TTT TCA TTA ACA ACC AAC CAT TC GTC CTG GTG GCT TCG TTG C
SAP 5	ATA ATT AAT CTA AAG TCA AAG TTC CAA TCT CCA GAG GAG TAC TTC C
SAP 6	TTC TTC AAA CGT TTT AAT TCT CT CAT AAA TGA CTT CAA AAT ATA AAT
SAP 8	CTC TAT AAA GTA GAA ATA CTT GA GTT GAC ACA GGT TCT TCT G
SAP 9	CCT CTA TTG TGT GTA AAT G CTG CCA CCA AAT GAG AC
EFB1:	ATT GAA CGA ATT CTT GGC TGA C CAT CTT CTT CAA CAG CAG CTT G

#### 3.7.2 Elongationsfaktor (Primer EFB)- Erläuterung

Um eine mögliche Verunreinigung des Amplifikationsproduktes mit genomischer DNA (gDNA) sichtbar machen zu können, wird ein spezieller Primer für intron-enthaltende Gene verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Abschnitt aus dem Elongationsfaktor-Gen (EFB) [23]. RNA enthält keine Introns mehr und so dürfen auch in einer Kopie der RNA (cDNA) keine Introns mehr vorhanden sein. So ergeben sich unterschiedlich große Amplifikationsprodukte: 891 bp bei

Verwendung von genomischer DNA (entsprechend einer mit gDNA verunreinigten Probe), sowie ein 526 bp großes Fragment, wenn eine Amplifikation nur der cDNA stattgefunden hat [36].

#### 3.7.3 Vorversuche

Für die PCR wurden in zahlreichen Vorversuchen optimale Versuchsbedingungen empirisch erarbeitet: Hier wurde ein PCR Programm sowie ein optimaler Reaktionsansatz erstellt.

Zunächst wurde die Funktionsfähigkeit der neun Primer-Paare (SAP1-EFB) getestet. Zugleich konnten hierbei Referenzwerte im Sinne einer Positivkontrolle für die späteren PCRs bestimmt werden.

#### 3.7.4 Herstellung einer Positiv-Kontrolle

Hierfür wird DNA aus einem kulturell angezüchteten *Candida albicans* Stamm ATCC 10321 isoliert.

Damit alle SAP dargestellt werden können, ist es notwendig, dass es sich bei der DNA um genomische DNA handelt. Mittels cDNA können nur die im Moment aktiven Gene dargestellt werden. Um jedoch einen Referenzwert (angegeben in Basenpaaren) zu erhalten, muß gewährleistet sein, daß alle Primer an die Ziel-DNA binden können. Aus diesem Grund wird für eine Positivkontrolle genomische DNA verwendet.

In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten für eine DNA-Extraktion beschrieben. Am einfachsten lässt sich DNA aus *Candida albicans* gewinnen, in dem eine Suspension aus Aqua inj. und Hefezellen hergestellt und diese anschließend erhitzt wird.

Ein Eppendorfreaktionsgefäß wird mit 0.5 ml Aqua a.i. gefüllt. Dann werden mit einer sterilen Öse von einer zuvor beimpften Agarplatte mehrere Hefekulturen abgenommen und in das Reaktionsgefäß eingebracht. Im nächsten Schritt wird diese Suspension vermischt und in einem Thermocycler für 5 Minuten bei 95 ° C erhitzt. Dies führt zum Aufbrechen der Hefezellen und zur Freisetzung von DNA.

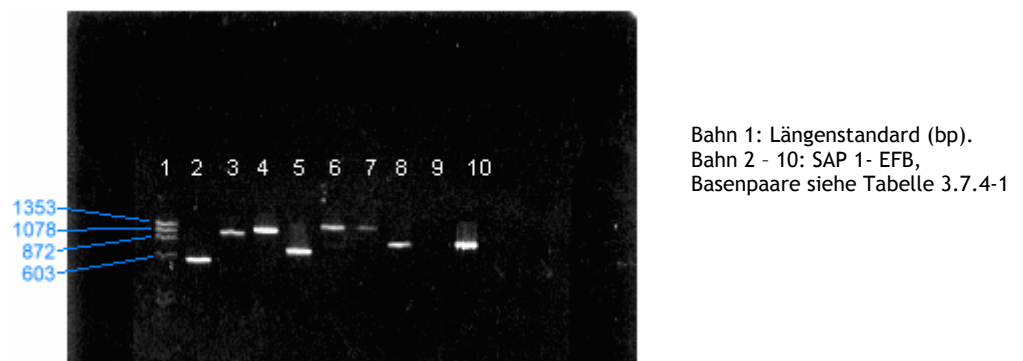
In einer einfachen PCR erfolgt dann die Vermehrung der gewünschten Zielsequenzen von SAP 1 bis EFB (Kapitel 3.8).

Hierbei kann für jedes Primerpaar ein Amplifikationsprodukt dargestellt werden (Tabelle 3.7.4-1, Abbildung 3.7.4-1). Die gleichen Primer-Paare wurden außerdem gegenüber DNA aus *Candida krusei*, *glabrata*, und *tropicalis* getestet, um sicherzustellen, dass die verwendeten Primer spezifisch für *Candida albicans* sind. Hier konnte kein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden.

Tabelle 3.7.4-1. Darstellung der amplifizierten Genabschnitte in Basenpaaren (bp).

SAP 1: 551 bp	SAP 2: 1081 bp	SAP 3: 1235 bp	SAP 4: 732 bp	SAP 5: 1479 bp
SAP 6: 1400 bp	SAP 8: 800 bp	SAP 9: 1353 bp	EFB (cDNA): 526 bp	EFB (genomisch): 891 bp

Abbildung 3.7.4.-1. Darstellung der Genabschnitte SAP 1 – EFB mit genomischer DNA.



### 3.8 Erstellung des PCR-Programms sowie Erstellung des Reaktionsansatzes (Mastermix)

Um ein optimales Ergebnis zu erhalten wurde die PCR mit unterschiedlichen Zyklen (25, 30, 35, 40), unterschiedlichen Temperaturstufen (Denaturierung 94-97 °C, Annealing 48-60° C) sowie unterschiedlichen Zeiten (Denaturierung 45 Sekunden -10 Minuten, Annealing 30 Sekunden – 1 Minuten 45 Sekunden, und Elongation 7-10 Minuten) durchgeführt. Als optimal erwies sich folgendes PCR-Programm (Tabelle 3.8-1):

Tabelle 3.8-1. Ermittelte PCR Zyklen.

Denaturierung	95 ° C für 3 Minuten	1 Zyklus
Annealing	52 ° C für 3 Minuten	
Elongation	72 ° C für 3 Minuten	
Denaturierung	95 ° C für 45 Sekunden	30 Zyklen
Annealing	52 ° C für 45 Sekunden	
Elongation	72 ° C für 1 Minuten 45 Sekunden	
final elongation	72 ° C für 7 Minuten	

In einem ersten Zyklus erfolgt für jeweils 3 Minuten ein Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritt. Anschließend folgen 30 Zyklen mit jeweils 95° für 45 Sekunden, 52° für 45 Sekunden und 72° für 105 Sekunden; ein letzter Verlängerungsschritt (final elongation) erfolgt bei 72° / 7 Minuten (siehe Tabelle 3.8-1).

Da durch Hemmstoffe im Vaginalabstrich beim ersten PCR-Durchgang zu wenig DNA amplifiziert wird, muß die PCR ein zweites Mal nach obigem Schema durchgeführt werden. Eine dritte PCR brachte keine Verbesserung des Ergebnisses eher eine Zunahme unspezifischer Amplifikationsprodukte.

Ferner wurden die PCRs mit unterschiedlicher Zusammensetzung des „Mastermix“ durchgeführt. Variiert wurden hier die Konzentrationen von MgCl<sub>2</sub>, die Primerkonzentrationen, die NTP-Konzentrationen, die taq-Polymerase sowie die Menge der Ziel-DNA. Optimal erwies sich folgende Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (angegeben für jeweils eine Probe):

### 3. Material und Methode

10X Puffer	5.00 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3.00 µl
10 mM NTP Mix	1.00 µl
10 µM Primer A	1.00 µl
10 µM Primer B	1.00 µl
taq DNA Polymerase (5 units/µl)	0.25 µl
H <sub>2</sub> O	36.75 µl
Ziel-DNA	2.00 µl

Nach oben ermittelten Reaktionsbedingungen führten wir sämtliche PCRs durch.

Insgesamt werden für eine Patientenprobe pro PCR neun Reaktionsgefäße (SAP 1- EFB) benötigt, sowie neun Reaktionsgefäße für die Negativkontrolle. Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgt auf Eis um eine frühzeitige Aktivierung von Enzymen zu verhindern. Zunächst werden in jedes Reaktionsgefäß 10 µl H<sub>2</sub>O , je 1µl Primer A bzw. Primer B pipettiert, sowie je 2 µl cDNA (aus der rT-Reaktion) hinzugegeben und bei 95 °C für 5 min erhitzt.

In ein 1.5 ml Reaktionsgefäß werden (je Probe) 26.75 µl H<sub>2</sub>O pipettiert. Anschließend werden MgCl<sub>2</sub>, NTP, 10 x Puffer und taq-Polymerase hinzugegeben (siehe oben). Nach dem Mischen werden jeweils 36 µl des Reaktionsansatzes zu der Primer-DNA-Lösung gegeben, ein Tropfen Öl hineingetropft und das PCR Programm gestartet (Abbildung 3.8-1).

Abbildung 3.8-1. Eppendorfreaktionsgefäß mit Primer A bzw. Primer B (blau), Ziel-DNA (schwarz), Mastermix (weiß) und darüberliegende Ölschicht (türkis).



Nach der ersten PCR wird nach gleichem Schema eine zweite PCR angesetzt. Hier wurde jedoch nur 1 µl der Ziel-DNA verwendet. Nach dieser zweiten PCR

können nun die Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden.

#### **3.9 Detektion der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese**

Eine einfache Möglichkeit ein Amplikon nachzuweisen, besteht darin eine kleine Menge des PCR-Produktes auf einem Agarosegel aufzutrennen. Durch Färbung mit Ethidiumbromid – einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert- und UV-Licht kann das Amplikon sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung des Amplikons trennt man in einer benachbarten Spur einen Marker auf. Anhand des Markers können die Basenpaare bzw. die Größe des Amplikons bestimmt werden.

Zunächst wird ein 1.5 % Agarose Gel hergestellt: 35 g Agarose werden in 25 ml 1x TBE aufgelöst und in einer Mikrowelle etwa 5 Minuten lang erhitzt, nach kurzem Abkühlen werden 2 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Agaroselösung wird sodann in eine Gelkammer gegossen. Die Schichtdicke betrug dabei maximal 0.5 cm. Danach erfolgte der Einsatz einer Taschenschablone in Kammform in das noch flüssige Gel. Nach dessen Erstarren mußte die Schablone sehr vorsichtig entfernt werden, dann konnte es in das Elektrophoresegerät eingesetzt werden. Als Puffer wird mit 1x TBE aufgegegossen.

Jeweils 2 µl des PCR-Produktes wurden mit 9 µl „loading buffer“ versetzt und in Vertiefungen des Gels pipettiert. Für den Standard werden 2 µl Marker, 2 µl 1x TE und 9 µl Auftragslösung zusammenpipettiert (Tabelle 3.9-1).



### 3. Material und Methode

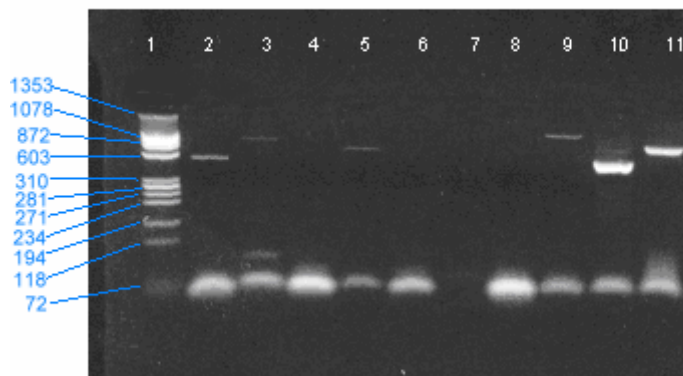
Tabelle 3.9-1. Ansatz für die Gelelektrophorese.

Gel	Standard	Patientenprobe/Negativ bzw. Positivkontrolle
37.5 mg Agarose	2.0 µl Loading buffer	2.0 µl Loading buffer
+ 25.0 ml 1 X TBE	+ 0.2 µl Marker	+ 9.0 µl DNA-Lösung
erhitzen für ca 5 min	+ 9.0 µl 1 X TE	
+ 2 µl Ethidiumbromid		

Die angelegte Spannung betrug 300 V, die Stromstärke 120 mA. Die Elektrophorese war beendet, wenn die untere Bromphenolblaubande gut die Hälfte der Laufstrecke zurückgelegt hatte.

Der bei der Färbung entstandene DNA-Ethidiumbromid-Komplex erschien nach UV-Licht-Einwirkung als eine orange leuchtende Bande. Eine Photographie des Gels dokumentiert das Ergebnis (Abbildung 3.9-1).

Abbildung 3.9-1. rT-PCR/PCR Ergebnis einer Patientin mit CRVVC.



Auf Bahn 1 ist der Längenstandard dargestellt (bp). Exprimiert wurden hier

**Bahn 2:** SAP 1 (551 bp),  
**Bahn 3:** SAP 2 (1081 bp),  
**Bahn 5:** SAP 4 (732 bp) und  
**Bahn 9:** SAP 9 (1353 bp).

In Bahn 10 und Bahn 11 ist EFB dargestellt:  
in Bahn 10 mit cDNA (526 bp) und in Bahn  
11 mit genomischer DNA (891 bp).

## 4. Ergebnisse

Insgesamt wurden in dieser Studie 95 Patientinnen mit Verdacht auf CRVVC untersucht. Bei insgesamt 64 Patientinnen konnte mittels rt-PCR bzw. PCR *Candida albicans* eindeutig nachgewiesen werden. Bei 31 Patientinnen gelang kein molekularbiologischer Nachweis von *Candida albicans*, trotz eines charakteristischen Beschwerdebildes für CRVVC. In der Kontrollgruppe wurden 40 Patientinnen untersucht. Hiervon konnten letztlich 26 Patientinnen der Kontrollgruppe zugeordnet werden. Voraussetzung für den Einschluss in die Kontrollgruppe war ein positiver PCR Nachweis für *Candida albicans* sowie der Ausschluss einer akuten bzw. chronischen Vulvovaginalcandidose.

### 4.1 Statistische Methoden

Um das Alter als einziges quantitatives Merkmal auf einen Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppe zu testen, wurde der Test von Wilcoxon, Mann und Withney bzw. der U-Test verwendet. Für den Vergleich der qualitativen Merkmale zwischen den einzelnen Patientengruppen diente der Vierfeldertest mit Kontingenztafeln. Für die Testergebnisse wird der p-Wert angegeben und mit  $p < 5 \%$  als signifikant bewertet.

### 4.2 Anamnese

Tabelle 4.2-1. Anamnese der Candida- und Kontrollgruppe  $p > 5 \%$ .

besondere Anamnese	Candidagruppe n = 64	Kontrollgruppe n = 26
Durchschnittsalter (S.D.)	36,0 (10,311)	38,385 (12,195)
Kontrazeption (%)	21 (32,8)	4 (15,4)
Geburten (%)	26 (40,6)	10 (38,7)
Aborte (%)	4 (6,3)	1 (3,9)
Allergien (%)	9 (14,1)	4 (15,4)

In der Candidagruppe gaben 21 (32,8 %) Patientinnen an weder hormonell noch nicht-hormonell zu verhüten. 26 (40,6 %) Patientinnen haben 1 oder mehr Kinder, 4 (6,3 %) Patientinnen hatten mindestens 1 Abort. Bei 9 Patientinnen konnten anamnestisch Allergien erfragt werden (14,1 %). Insgesamt ergaben sich hinsichtlich der anamnestischen Daten in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4.2-1).

### 4.3 Mikrobiologische Untersuchungen

Tabelle 4.3-1. Ergebnis der kulturellen Anzüchtung in der Candida- und Kontrollgruppe.

Kultureller Pilznachweis	Candidagruppe N = 95	Kontrollgruppe n = 40
Candida albicans	34 (35,8)	15 (37,5)
Candida glabrata	11 (11,6 )	0
Candida tropicalis	3 (3,2)	0
Candida krusei	1 (1,1)	0
negativer Pilznachweis	46 (48,4)	25 (62,5)

Bei den Candidapatientinnen wurde ebenso wie bei der Kontrollgruppe, neben der PCR eine kulturelle Diagnostik durchgeführt. In 34 (35,8 %) Fällen konnte in der Candidagruppe *Candida albicans* kulturell nachgewiesen werden. In 11 Fällen fand sich *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* in 3 Fällen und *Candida krusei* in 1 Fall. In 46 (48,4 %) Fällen konnte kulturell kein Pilzwachstum festgestellt werden.

In der Kontrollgruppe konnte in 15 (37,5 %) Fällen *Candida albicans* kulturell isoliert werden. In 25 Fällen blieb ein kulturelles Pilzwachstum aus.

#### 4.4 Molekularbiologische Untersuchungen

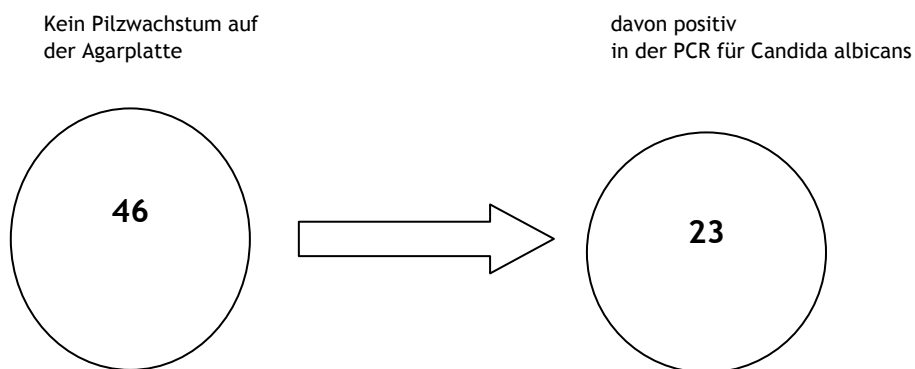
##### 4.4.1 Allgemeine Ergebnisse Candida-Gruppe

In der Candidagruppe konnte in 46 (48,4 %) Fällen kulturell kein Pilz isoliert werden. Mittels der sensitiveren Methode der PCR bzw. rT-PCR konnte jedoch in 23 (50,0 %) Fällen dennoch eine *Candida albicans* Infektion diagnostiziert werden (Abbildung 4.4.1-1).

---

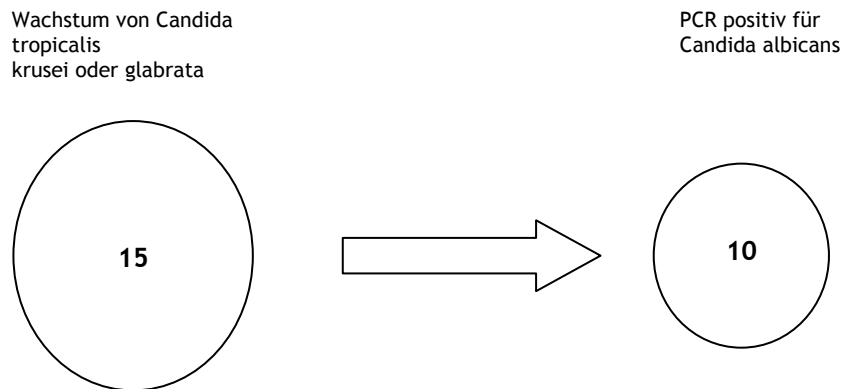
Abbildung 4.4.1-1. Positiver Pilznachweis mittels rT-PCR bei negativer Pilzkultur in der Candidagruppe

---



In insgesamt 15 (15,5 %) Fällen konnte kulturell eine andere *Candida* spezie isoliert werden. Auch in diesen Fällen wurde eine rT-PCR durchgeführt. Hier konnte bei 10 (66,7 %) Patientinnen dennoch eine *Candida albicans* Infektion nachgewiesen werden. Möglicherweise lag hier eine Mischinfektion vor (Abbildung 4.4.1-2.).

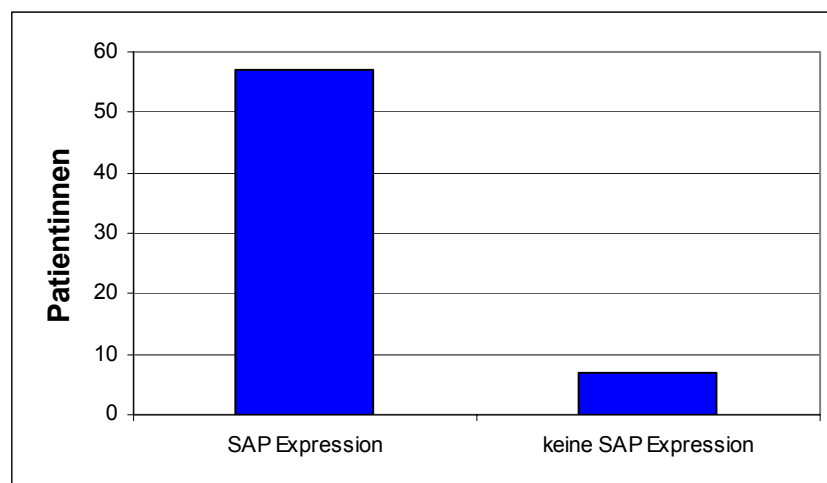
Abbildung 4.4.1-2. Positiver Pilznachweis mittels rT-PCR bei kulturellem Nachweis von *C. glabrata*, *krusei* oder *tropicalis*.



### 4.4.2 Spezielle Ergebnisse in der Candida-Gruppe: SAP-Expression

Insgesamt konnte von 95 untersuchten Patientinnen der Candida-Gruppe in 57 Fällen eine Expression von SAP nachgewiesen werden. In 7 Fällen konnte trotz eines positiven *Candida albicans* Nachweises in der PCR keine SAP Expression festgestellt werden (Abbildung 4.4.2-1).

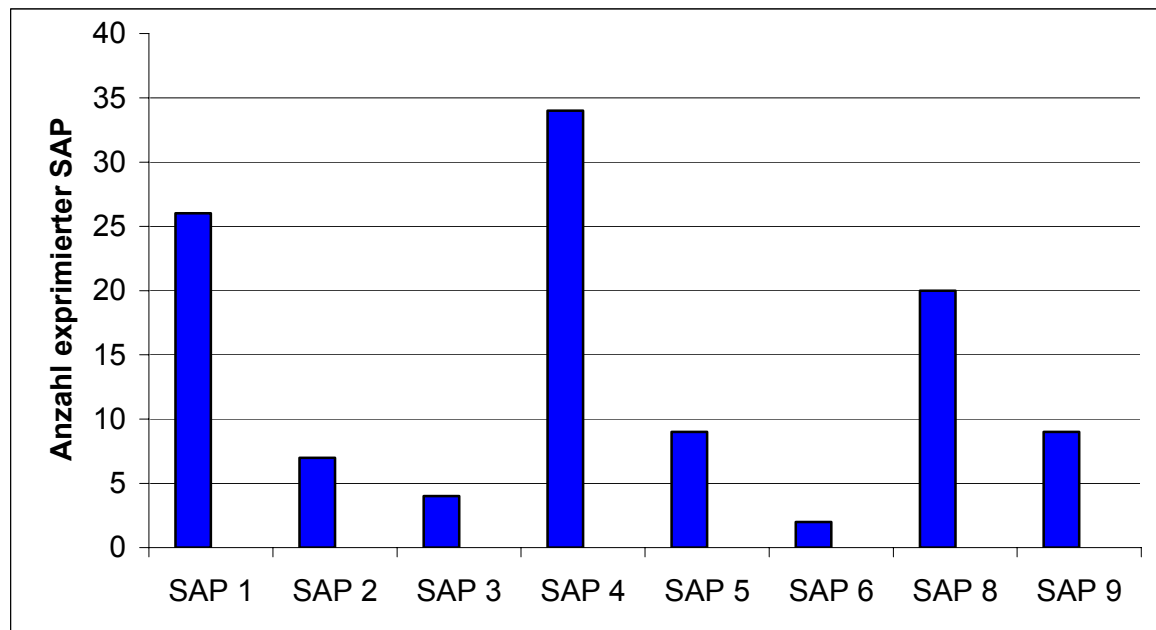
Abbildung 4.4.2-1. Übersicht über die Expression von SAP in der Candida-Gruppe.



In 3 Fällen konnte trotz eines positiven kulturellen Nachweises von *Candida albicans* in der PCR *Candida albicans* nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt ergab sich hinsichtlich der SAP-Expression 1-9 folgendes Bild (Abbildung 4.4.2-2):

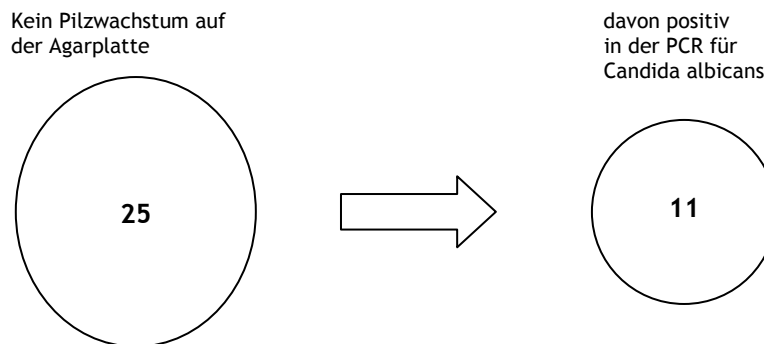
Abbildung 4.4.2-2. Übersicht über die exprimierten SAP in der Candidagruppe.



#### 4.4.3 Allgemeine Ergebnisse in der Kontrollgruppe

In 25 (62,5 %) Fällen konnte kulturell kein Pilz isoliert werden. Mittels der sensitiveren Methode der PCR bzw. rT-PCR konnte jedoch in 11 (44,0 %) Fällen dennoch eine *Candida albicans* Besiedlung nachgewiesen werden (Abbildung 4.4.3-1).

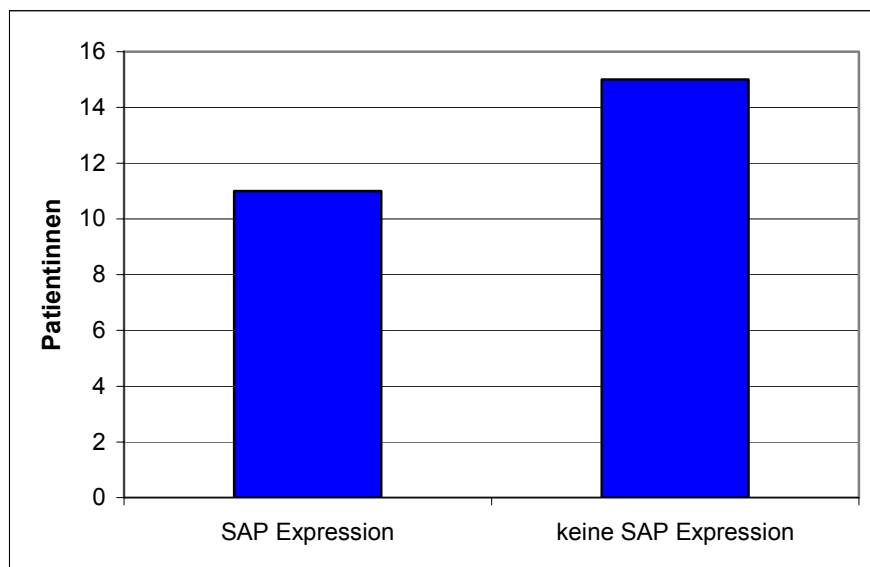
Abbildung 4.4.3-1. Positiver Pilznachweis mittels rT-PCR bei negativer Pilzkultur in der Kontrollgruppe



#### 4.4.4 Spezielle Ergebnisse in der Kontrollgruppe: SAP-Expression

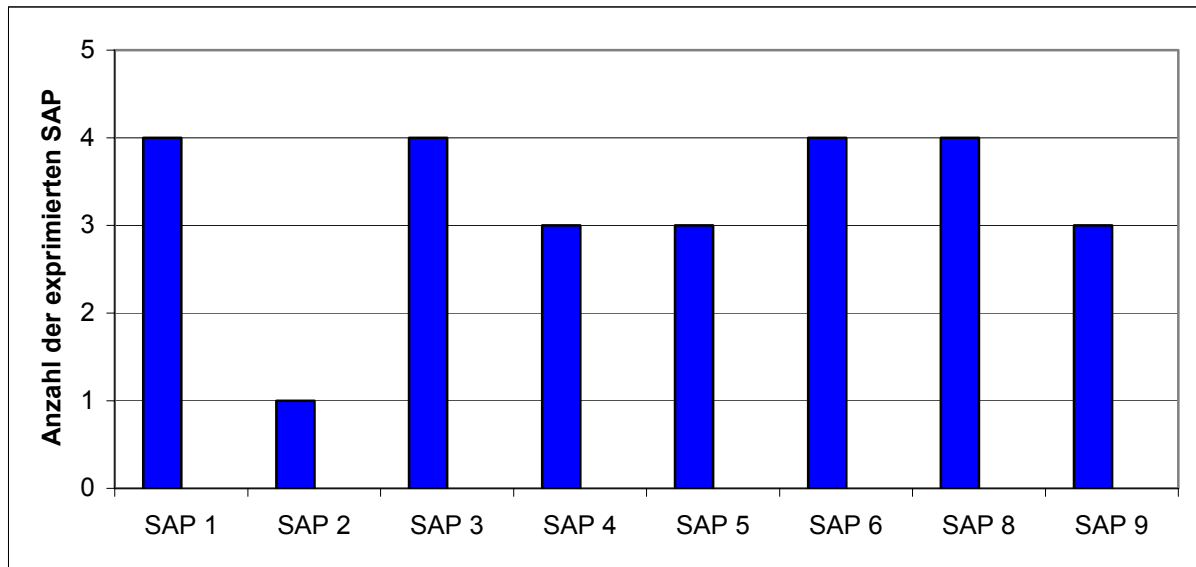
Insgesamt konnte in der Kontrollgruppe in 11 Fällen eine Expression von SAP nachgewiesen werden. In 15 Fällen konnte trotz eines positiven Candida albicans Nachweises in der PCR keine SAP- Expression festgestellt werden (Abbildung 4.4.4-1).

Abbildung 4.4.4-1. Übersicht über die Expression von SAP in der Kontrollgruppe.



Insgesamt ergab sich hinsichtlich der SAP-Expression 1-9 in der Kontrollgruppe folgendes Bild (Abbildung 4.4.4-2):

Abbildung 4.4.4-2. Übersicht über die exprimierten SAP in der Kontrollgruppe.



#### 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die genaue Ätiologie der CRVVC ist noch ungeklärt. Mehrere Faktoren scheinen daran beteiligt zu sein. Vermutlich spielen sowohl Wirtsfaktoren als auch Faktoren von *Candida albicans* selbst eine entscheidende Rolle bei der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung einer vaginalen *Candida albicans* Infektion. Verschiedene Faktoren scheinen prädisponierend für eine Candidainfektion zu sein. Allerdings konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen prädisponierenden Faktoren wie beispielsweise Allergien, Kontrazeptiva etc. beobachtet werden. Mittels der kulturellen Diagnostik war es möglich in relativ kurzer Zeit ein mögliches Pilzwachstum zu objektivieren und eine Selektion der untersuchten Patientinnen vorzunehmen. Es zeigte sich aber, dass die molekularbiologischen Methoden wie rT-PCR und PCR einer kulturellen Diagnostik deutlich überlegen sind. Mit alleiniger kultureller Diagnostik wäre so (Candida- und Kontrollgruppe zusammengefasst) in 34 von 71 (47,9 %) kulturnegativen Proben *Candida albicans* nicht festgestellt worden. Auch bei kulturellem Nachweis einer anderen *Candida* species (*C. tropicalis*, *C. krusei* oder *C. glabrata*) konnte mittels rT-PCR und PCR in 10 von 15 Fällen (Candidagruppe) auch eine Beteiligung von *Candida albicans* nachgewiesen



werden. Betrachtet man bei den Mischinfektionen die anamnestischen Daten und das Expressionsmuster der Isoenzyme ergaben sich aber keine Unterschiede im Vergleich zu den reinen *Candida albicans* Infektionen. Hieraus ist ersichtlich wie sensitiv rT-PCR und PCR sind. Allerdings war es in drei Fällen nicht möglich mit den PCR-Untersuchungen *Candida albicans* nachzuweisen, obwohl kulturell *Candida albicans* eindeutig nachgewiesen wurde. Auf Grund der hohen Sensitivität molekularbiologischer Methoden erscheint deren Einsatz trotz des relativ hohen Aufwandes durchaus sinnvoll um die exakte Diagnose einer Vulvovaginalcandidose zu stellen, insbesondere dann, wenn typische Beschwerden bestehen und die bisherigen diagnostischen Methoden nicht richtungsweisend waren.

Hinsichtlich des Expressionsverhaltens der SAP konnte in dieser Arbeit kein für eine chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose typisches Isoenzymmuster beobachtet werden. Ebenso wenig fanden wir ein typisches Expressionsmuster bei mit *Candida albicans* kolonisierten, beschwerdefreien Patientinnen. Der Nachweis von SAP-Isoenzymen reichte von keinem Isoenzym (7 Proben) bis hin zu sieben gleichzeitig exprimierten Isoenzymen (Probe Nr. 73: SAP 1, SAP 2, SAP 3, SAP 4, SAP 6, SAP 8 und SAP 9). Betrachtete man hierbei die anamnestischen Daten so ergaben sich im Vergleich zu den anderen Proben keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur nur mit *Candida albicans* kolonisierten Kontrollgruppe fand sich innerhalb der symptomatischen Candidagruppe SAP 1 und SAP 4 signifikant häufiger. Zudem fanden sich 3 Isoenzyme die in der Candidagruppe besonders häufig exprimiert wurden: SAP 1, SAP 4 und SAP 8. Auch wurden SAP innerhalb der Candidagruppe signifikant häufiger sezerniert als in der asymptomatischen Kontrollgruppe. Trotzdem konnten in 11 von 26 Fällen (42,3 %) in der Kontrollgruppe SAP nachgewiesen werden, wobei hier eine nahezu gleichhäufige Verteilung der einzelnen Isoenzyme beobachtet werden konnte.

Ergebnisse:

1. Die Expression von SAP ergab keinen Zusammenhang mit den anamnestischen Daten.

2. Sowohl in der Candidagruppe als auch in der asymptomatischen Kontrollgruppe werden SAP exprimiert.
3. In der Candidagruppe werden signifikant häufiger SAP exprimiert als in der Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ )
4. Das SAP-Expressionsmuster ist nicht einheitlich. So wurden teilweise bei einigen Proben nur 1 oder 2 SAP exprimiert, in anderen Proben konnten drei oder mehr SAP gleichzeitig nachgewiesen werden.
5. Vergleicht man die SAP der Candidagruppe mit denen der Kontrollgruppe so wurden SAP 1 ( $p < 0.05$ ) und SAP 4 ( $p < 0.001$ ) signifikant häufiger sezerniert.
6. Hinsichtlich dem Nachweis von *Candida albicans* sind PCR bzw. rT-PCR der kulturellen Diagnostik deutlich überlegen.

### 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden sekretorische Aspartatproteinasen von *Candida albicans* bei Frauen mit chronisch rezidivierender Vulvovaginalcandidose nachgewiesen. Hierzu wurde RNA aus Vaginalabstrichen isoliert und mittels reverser-Transkriptase-PCR die Expression dieser Proteasen dargestellt. Mit Hilfe der Primer SAP 1-6 und SAP 8-9 erfolgte der Nachweis einer in-vivo Expression dieser Proteasen.

In der Candidagruppe konnte so von insgesamt 95 untersuchten Patientinnen mit CRVVC in 57 Fällen eine Expression der sekretorischen Aspartatproteinasen beobachtet werden. In 7 Fällen konnte keine Expression der SAP 1-9 nachgewiesen werden, jedoch bei eindeutig positivem PCR-Befund für *Candida albicans*. So wurde SAP 1 bei 26 Proben gefunden, SAP 2 bei 7, SAP 3 bei 4, SAP 4 bei 34, SAP 5 bei 9, SAP 6 bei 2, SAP 8 bei 20 und SAP 9 bei 9 Proben. In der Kontrollgruppe konnte bei 11 von 26 Proben eine SAP –Expression beobachtet werden. Hier fand sich SAP 1 bei 4, SAP 2 bei 1, SAP 3 bei 4, SAP 4 bei 3, SAP 5 bei 3, SAP 6 bei 4, SAP 8 bei 4 und SAP 9 bei 3 Proben. Bei 15 Proben konnte keine Expression der SAP 1-9 festgestellt werden, obwohl *Candida albicans* in der PCR eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dass es sowohl bei einem asymptomatischen wie symptomatischen Candidabefall zu einer Expression von SAP kommt, konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden [4][26]. Interessant erscheint die Beobachtung dass es in der Gruppe der symptomatischen Patientinnen in sieben Fällen und in der Gruppe der asymptomatischen in 15 Fällen (57,7 %) zu **keiner** SAP-Expression kam, trotz eines eindeutigen Nachweises von *Candida albicans* mittels PCR. Denkbar wäre hier eine Aktivität von anderen Proteasen als SAP 1-9. Das signifikante Fehlen der SAP-Expression in der Kontrollgruppe, könnte auch den Schluß zu lassen, dass die SAP für eine Beschwerdesymptomatik verantwortlich sind. Diese Hypothese müsste jedoch durch weitere Untersuchungen gestützt werden, da auch in der Kontrollgruppe bei immerhin 11 Proben (42,3 %) eine SAP-Expression beobachtet werden konnte, obwohl keine Beschwerdesymptomatik vorlag.

## 5. Diskussion

Betrachtet man die im einzelnen exprimierten Proteasen so ergaben sich im Vergleich von Candida- und Kontrollgruppe durchaus Unterschiede in der Expressionshäufigkeit und Dominanz der einzelnen Isoenzyme:

In der Candidagruppe dominierten hierbei SAP 4, SAP 1 und SAP 8 gefolgt von SAP 5 und SAP 9 die gleichhäufig exprimiert wurden. Die Proteasen SAP 2, SAP 3 und SAP 6 wurden am seltensten exprimiert. Innerhalb der Kontrollgruppe fand sich ein eher homogenes Expressionsmuster: So fanden sich SAP 1 und SAP 3 sowie SAP 6 und SAP 8 etwa gleichhäufig vor SAP 4, SAP 5, SAP 9 und SAP 2.

In Studien mit Mutanten die nicht in der Lage waren SAP 1-3 (Hube 1997) bzw. SAP 4-6 (Sanglard 1997) zu sezernieren konnte die Bedeutung dieser Isoenzymgruppen bei einer Candidainfektion nachgewiesen werden. Auch De Bernardis et al (1999) konnten in einem Vaginitismodell der Ratte mit Hilfe von Stämmen mit fehlender SAP 1-3 Bildung die Wichtigkeit dieser Proteasengruppe für eine Infektion zeigen. Fehlten diese Genprodukte war die Virulenz von *Candida albicans* deutlich herabgesetzt. So erscheint es nicht verwunderlich wenn in dieser Arbeit SAP 1 und SAP 4 zu den dominierenden Proteasen innerhalb der symptomatischen Patientengruppe zählen. So konnte bei der Candidagruppe in 32 von 64 Proben (50,0 %) die Beteiligung mindestens eines dieser Isoenzyme nachgewiesen werden, in der Kontrollgruppe war dies in 6 von 26 Proben (23,1 %) der Fall. Isoliert betrachtet dominierte in der Candidagruppe SAP 1, in der Kontrollgruppe fanden sich SAP 1-3 nahezu gleichhäufig. Assoziiert wird diese Proteasengruppe mit einem phänotypischen Wechsel. Hieraus kann der „phenotypic switch“ als ein wichtiger Virulenzfaktor bei der Kolonisierung einer Wirtsnische geschlossen werden. Da im Vergleich zur Kontrollgruppe SAP 1 in der Candidagruppe signifikant häufiger gefunden wurde, könnte dies auch als Hinweis für einen erhöhten phänotypischen Wechsel bei einer CRVVC gewertet werden. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, weshalb die CRVVC so schwierig zu behandeln ist und zu Rezidiven neigt. Vargas et al (2000) untersuchten in einer Studie den Zusammenhang zwischen phänotypischem Wechsel und Medikamentenresistenz bei HIV-Infizierten Patienten mit oraler Candidose. Hier

## 5. Diskussion

konnte gezeigt werden, dass bei hohen phänotypischen Wechseln die Wirksamkeit antifungaler Medikamente deutlich reduziert war.

Betrachtet man SAP 4-6 als eine Gruppe, so konnte in der Candidagruppe mindestens eines dieser Isoenzyme in 25 von 64 Proben (39,1 %) gefunden werden. In der Kontrollgruppe war dies bei 9 von 26 Proben der Fall (34,6 %). Zu einer Gruppe zusammengefasst bestehen zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patientinnen im Bezug auf SAP 4-6 kaum Unterschiede. Betrachtet man die SAPs aber isoliert fällt in der Candidagruppe eine deutliche Dominanz von SAP 4 auf, in der Kontrollgruppe hingegen eine insgesamt gleichmäßige Verteilung von SAP 4-6. Die Isoenzymgruppe SAP 4-6 wird vor allem dann gefunden, wenn ein Übergang in die invasive Wachstumsform (Hyphenform) vorliegt (Hube 1994, White 1995). Isoliert betrachtet konnte in der Candidagruppe SAP 4 signifikant häufiger gefunden werden als in der Kontrollgruppe, was den Schluss nahe legt, dass in der symptomatischen Gruppe die Mehrzahl der Pilze in der gewebsinvasiven Form, der Hyphenform vorliegt.

Chen et al [6] konnten nachweisen, dass SAP 5 während eines Wechsels von Hefe zu Hyphenform früher als SAP 4 und SAP 6 exprimiert wird. SAP 4 und SAP 6 fanden sich vor allem dann, wenn ein niedriger pH-Wert vorlag. Diese Beobachtung lässt sich gut mit den Ergebnissen in dieser Arbeit vereinen, bei denen SAP 4 eine der dominierenden Proteasen ist. Hier liegt jedoch ein entscheidender Unterschied zu Untersuchungen von Naglik et al (2003) vor. Hier wurde die Expression von SAP bei Vaginalcandidosen und oralen Candidosen untersucht, als dominierende Isoenzyme fanden sich bei den Vaginalcandidosen vor allem SAP 1, SAP 3 und SAP 8. SAP 4 war in dieser Studie jedoch mit oralen Candidosen assoziiert. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit nahmen Naglik et al. keine Differenzierung zwischen akuter und chronisch rezidivierender Candidose vor. Auch widerspricht dies der Beobachtung von Chen et al [6] die SAP 4 vorwiegend in saurem Milieu fanden. Über die Gruppe der SAP 4 – 6 ist aber zu wenig bekannt, um dieses Ergebnis genau interpretieren zu können.

## 5. Diskussion

In Untersuchungen von Schaller et al [33] wurden drei Patientinnen mit Vulvovaginalcandidose untersucht, allerdings unterblieb auch hier eine Differenzierung von akuter und chronischer Vulvovaginalcandidose. Kritisch muss auch die geringe Patientenzahl von 3 Patientinnen angemerkt werden. Hier konnte eine Expression von SAP 1, SAP 6, SAP 9 und SAP 10 nachgewiesen werden, wohingegen SAP 3, SAP 4, SAP 7 und SAP 8 nicht nachgewiesen werden konnten. Allerdings konnte in einem in-vitro Modell mit künstlicher Vaginalschleimhaut vor allem nach längerer Infektion SAP 1, SAP 2, SAP 4 - SAP 7, SAP 9 und SAP 10 nachgewiesen werden. Dies stimmt in etwa mit den Ergebnissen unserer Arbeit überein, bei der SAP 1 und SAP 4 zu den am häufigsten exprimierten SAP gehören.

Auch die von Schaller et al [35] untersuchte zeitliche Abfolge der SAP-Expression ist mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar: So konnten SAP 6 und SAP 8 vor allem dann nachgewiesen werden, wenn die Infektion in tiefere Hautschichten vorgedrungen war bzw. die Infektion bereits über einen längeren Zeitraum besteht, was bei einer chronisch rezidivierenden Vulvovaginalcandidose der Fall ist. In unserer Arbeit ist SAP 8 das am dritthäufigsten exprimierte Isoenzym innerhalb der Candidagruppe. Weshalb aber SAP 6 so selten gefunden wurde bleibt unklar.

In dieser Studie konnte die Beteiligung von SAP an einer chronischen Vulvovaginalcandidose mittels rT-PCR und PCR nachgewiesen werden. Allerdings konnte weder in der Kontrollgruppe noch in der Candidagruppe ein einheitliches oder gar typisches SAP-Expressionsmuster für eine symptomatische bzw. asymptomatische Candidabesiedlung beobachtet werden. Es zeigt sich jedoch, dass bei einer CRVVC SAP 1, SAP 4 und SAP 8 eine dominierende Rolle zu spielen scheinen. In Zusammenschau mit anderen Studienergebnissen in denen eine verminderte Virulenz von *Candida albicans* bei Fehlen von SAP nachgewiesen werden konnte [14][34], könnte sich hieraus eine neue Therapieoption in der immer noch schwer zu behandelnden CRVVC ergeben: wie im Abschnitt 2.1 ausgeführt sind die Candidaproteinasen den HIV-

## 5. Diskussion

Proteinasen verwandt. Therapeutisch wäre hierbei der Einsatz von Proteinaseinhibitoren ähnlich wie in der HIV-Therapie denkbar. Vielversprechend erscheinen die in kürzlich erschienenen Studien beschriebenen Hinweise auf die Wirksamkeit von anti-HIV-Medikamenten: so konnte bei Einsatz von HIV-Proteinaseinhibitoren wie beispielsweise Amprenavir und Saquinavir eine deutlich verminderte Sekretion von SAP beobachtet werden [1][34].

### 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die sekretorischen Aspartatproteinasen SAP 1-9 von *Candida albicans* im Vaginalsekret bei Frauen mit chronisch rezidivierender Vulvovaginalcandidose nachzuweisen. Hierfür wurden bei insgesamt 135 Patientinnen Vaginalabstriche abgenommen und sowohl mikrobiologisch (Pilzkultur) als auch molekularbiologisch (rT-PCR, PCR) untersucht. Zudem erfolgte die Erhebung einer Anamnese. Für die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte zunächst eine RNA-Isolierung auf Basis der Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode, danach erfolgte die Synthese von cDNA, die DNA-Amplifikation mittels PCR und schließlich eine Gelelektrophorese. 95 Patientinnen mit typischen Beschwerdebild für eine CRVVC wurden der Candidagruppe und 40 asymptomatische Patientinnen ohne CRVVC oder akute Vulvovaginalcandidose der Kontrollgruppe zugeordnet. In der Candidagruppe konnte schließlich in 64 Fällen mittels rT-PCR und PCR *Candida albicans* sowie eine Proteasensekretion nachgewiesen werden, wobei in sieben Fällen keine der Proteasen SAP 1-9 nachgewiesen werden konnten. In der Kontrollgruppe war es in 26 Fällen möglich *Candida albicans* bzw. Proteasen nachzuweisen. Um sicherzustellen, dass es sich bei den amplifizierten Genabschnitten um eine Kopie der isolierten RNA (cDNA) und nicht um genomische DNA handelt, verwendeten wir eine interne Kontrolle (EFB). Zudem erfolgte ein Einschluss in die Candida- bzw. Kontrollgruppe nur dann, wenn sich bei EFB eine Bande bei 526 bp zeigte. Hierbei muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass bei diesem Elongationsfaktor-Gen auch Homologien zum menschlichen Genom bekannt sind.

In dieser Arbeit konnte bei Frauen mit einer CRVVC im Vergleich zu einer asymptomatischen Kontrollgruppe eine signifikant höhere Expression dieser Enzyme nachgewiesen werden. Allerdings konnte kein für eine CRVVC typisches Isoenzymmuster beobachtet werden. Es fanden sich jedoch gehäuft die SAP 1, 4 und 8. Die Tatsache, dass es in der Mehrzahl der untersuchten Proben zu einer Expression der Aspartatproteinasen kam, zeigt, dass diese Enzyme eine Bedeutung bei Entstehung bzw. Aufrechterhaltung einer CRVVC haben könnten. In einigen Studien konnte auch der Nachweis erbracht werden,



## 6. Zusammenfassung

dass bei Mutanten, die nicht in der Lage waren bestimmte SAP zu sezernieren, eine abgeschwächte Virulenz beobachtet werden konnte. Hieraus ergäben sich möglicherweise neue Therapieoptionen: so könnten ähnlich wie in der HIV-Behandlung neue Medikamente entwickelt werden, die speziell gegen die Candida-Proteinasen gerichtet sind.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Bein M, Schaller M, Korting HC: The secreted aspartic proteinases as a new target in the therapy of candidiasis. *Curr Drug Targets* 3, 351-357 (2002).
- [2] Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schäfer W, Cassone A : Evidence that Members of the Secretory Aspartyl Proteinases Gene Family, in Particular SAP 2, Are Virulence Factors for Candida Vaginitis. *J Infect Dis* 179, 201-208 (1999).
- [3] Bernardis F, Cassone A, Sturtevan J , Calderone R : Expression of Candida albicans SAP1 and SAP2 in Experimental Vaginitis. *Infect Immun* 63, 1887-1892 (1995).
- [4] Bernardis F., Chiani P, Ciccozz M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, Quinti I, Sullivan P, Cassone A: Elevated Aspartic Proteinase Secretion and Experimental Pathogenicity of Candida albicans Isolates from Oral Cavities of Subjects Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Infect Immun*. 64, 466-471(1996).
- [5] Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M.: The expression of secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from Candida albicans in murine macrophages. *Mol Microbiol* 28, 543-554 (1998).
- [6] Chen YC, Wu CC, Chung WL, Lee FJS: Differential secretion of SAP4-6 proteins in Candida albicans during hyphae formation. *Microbiology* 148, 3743-3754 (2002).
- [7] de Carvalho RJ, Cunha CM, Silva DA, Sopelete MC, Urzedo JE, Moreira TA, Moraes Pde S, Taketomi EA: IgA, IgE and IgG subclasses to Candida albicans in serum and vaginal fluid from patients with vulvovaginal candidiasis. *Rev Assoc Med Bras* 49, 434-8 (2003).
- [8] Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P: Role of Aspartic Proteases in Disseminated Candida albicans infection in Mice. *Infect Immun* 65, 551-556 (1997).

## 7. Literaturverzeichnis

- [9] Fidel P, Sobel D : Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. Clin Microbiol Rev 9, 335-348 (1996).
- [10] Heizmann W, Nolting S: Candida Intestinaltrakt Immunsystem Allergie. 1. Auflage, Promedico, Verlag für Wiss. und Medizin, 1999
- [11] Hoegl L, Ollert M, Korting H: The role of Candida albicans secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. J Mol Med 74, 135-142 (1996).
- [12] Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of Candida spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida. J Clin Microbiol, 41, 2629-32 (2003).
- [13] Hube B, Monod M, Schofield D, Brown A, Gow N: Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in Candida albicans. Mol Microbiol 14, 87-99 (1994).
- [14] Hube B, Sanglard D, Odds F, Hess D, Monod M, Schäfer W, Brown A, Gow N: Disruption of Each of the Secreted aspartyl Proteinase Genes SAP1, SAP2 and SAP3 of Candida albicans Attenuates Virulence Infect Immun 65, 3529-3538 (1997).
- [15] Hube B, Sanglard D, Schaller M, Ibrahim A, Odds F, Gow N : Welche Funktion haben sechs verschiedene Gene für sekretorische Proteinase von Candida albicans ? Mycoses 41, 47-50 (1998).
- [16] Hube B: Candida albicans Secreted Aspartyl proteinases Curr Top Mycol 7, 55-69 (1996).
- [17] Hube B: Possible role of secreted proteinases in Candida albicans infections. Rev Iberoam Micol 15, 65-68 (1998).
- [18] Hube B, Naglik J: Candida albicans proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology 147, 1997-2005 (2001).
- [19] Ibrahim A, Filler S, Sanglard D, Edwards JE, Hube B: Secreted aspartyl proteinases and interactions of candida albicans with human endothelial cells. Infect Immun 66, 3003-3005 (1998).
- [20] Kalo-Klein A, Witkin : Regulation of the immune response to Candida albicans by monocytes and progesterone. Am J Obstet Gynecol 164, 1351-1354 (1991).

## 7. Literaturverzeichnis

- [21] Koelsch G, Tang J, Loy JA, Monod M, Jackson K, Foundling SI, Lin X: Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1480, 117-131 (2001).
- [22] MacNeill C, Carey JC: Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Curr Womens Health Rep.* 1, 31-5 (2001).
- [23] Maneu V, Cervera AM, Martinez JP, Gozalbo B: Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (EFB1) coding for the elongation factor EF-1 $\beta$ . *FEMS Microbiology Letters* 145, 157-162 (1996).
- [24] Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D: Differential regulation of SAP 8 and SAP 9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 144, 2731-2737 (1998).
- [25] Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D: Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13, 357-68 (1994).
- [26] Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, Sweet SP, Challacombe SJ, Agabian N: In Vivo Analysis of Secreted Aspartyl Proteinase Expression in Human Oral Candidiasis. *Infect Immun* 67, 2482-2490 (1999).
- [27] Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik L, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ: Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis.* 188, 469-479 (2003).
- [28] Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B : *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67, 400-428 (2003)
- [29] Noverr MC, Phare SM, Toews GB, Coffey MJ, Huffnagle GB: Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun* 69, 2957-2963 (2001).

## 7. Literaturverzeichnis

- [30] Petersen EE, Distler C: Vorkommen von Hefepilzen im Vulvovaginalbereich bei symptomatischen und asymptomatischen Frauen. *Geburtsh u Frauenheilk* 59, 470-474 (1999).
- [31] Pfaller MA, Houston A, Coffmann S: Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for candida albicans, candida tropicalis, candida krusei, and candida glabrata. *J Clin Microbiol* 34, 58-61 (1995).
- [32] Sanglard D, Hube B, Monod M, Odds F, Gow N: A triple deletion of secreted aspartyl proteinase genes sap 4, sap 5, sap 6 of candida albicans causes attenuated virulence *Infect Immun* 65, 3539-3546 (1997).
- [33] Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B: The secreted proteinases Sap 1 and Sap 2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* 71, 3227-3234 (2003).
- [34] Schaller M, Krnjaic N, Niewerth M, Hamm G, Hube B, Korting HC: Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by candida albicans. *J Med Microbiol* 52, 247-249 (2003).
- [35] Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E, Hube B: Invasion of Candida albicans Correlates with Expression of Secreted Aspartic Proteinase during Experimental Infection of Human Epidermis. *J Invest Dermatol* 114, 712-717 (2000).
- [36] Schaller M, Schäfer W, Korting HC, Hube B: Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* 29, 605-615 (1998).
- [37] Sobel JD, Chaim W: Vaginal Microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol* 34, 2497-2499 (1996).
- [38] Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, Reed BD, Summers PR: Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 178, 203-211 (1998).

## 7. Literaturverzeichnis

- [39] Staib F: Proteolysis and pathogenicity of *Candida albicans* strains. *Mycopathol Mycol Appl* 37, 345-348 (1969).
- [40] Staib F: Serum-proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. *Sabouraudia* 4, 187-193 (1965).
- [41] Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J: Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6102-6107 (2000).
- [42] Tietz HJ : Therapy problems in chronic recurrent vaginal mycosis. *Ther Umsch* 59, 481-484 (2002).
- [43] Vargas K., Messer S.A., Pfaller M, Lockhart SR, Stapleton JT, Hellstein J, Soll DR: Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 38, 3595-3607 (2000).
- [44] Weissenbacher ER, Spitzbart H: *Mykosen in der Frauenheilkunde : Diagnostik und Therapie*. 2. Auflage, medifact-publishing, München, 2001
- [45] Weissenbacher ER: *Fluorpraktikum*. 4. Auflage, medifact-publishing, München (2001).
- [46] White S, Larsen B: *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. *Cell Mol Life Sci* 53, 744-749 (1997).
- [47] White TC, Agabian N: *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases: Isoenzyme Pattern Is Determined by Cell Type, and Levels Are Determined by Environmental Factors. *J Bacteriol* 177, 5215-5221 (1995).

## 8. Geräte und Material

### ***Probenentnahme***

NaCl 0,9 %	Krankenhaus Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München
RNA-later	Ambion, Austin Tx, USA
Eppendorfreaktionsgefäß 1,0 ml	Eppendorf, Deutschland
Wattetupfer	Krankenhaus Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München
Spritze 3,0 ml	Krankenhaus Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München

### ***Kulturelle Diagnostik***

Sabouraud-2 % Glucose-Agarplatten versetzt mit Gentamycin (0,1 g/l) und Chloramphenicol (0,05 g/l)	BioMerieux, Frankreich
Sabouraud Flüssigmedium BBL Chromagar™ Candida Chromagarplatten Brutschrank, Typ 2770	BioMerieux, Frankreich  Octon Dickinson, Sparks / USA Köttermann, Deutschland

### ***RNA-Isolierung, rT-Reaktion und PCR***

peqGold RNA-Pure	peqlab, Biotechnologie GmbH, Deutschland
Chloroform	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
Isopropanol	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
Ethanol 75 %	Krankenhaus Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München
DEPC H <sub>2</sub> O	Gibco Life Technologies, USA
RNAseOut	Gibco Life Technologies, USA
Glass beads	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
DNase I	Gibco, Life Technologies, USA
SUPERScript First-Strand Synthesis	Gibco, Life Technologies, USA

## 8. Geräte und Material

System for RT-PCR		
Thermocycler, Typ 9600		Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut / USA
Tischzentrifuge, Typ Z 230 MR		Hermle, Deutschland
Pipetten, Filter-Tips PE/PP		Nerbe plus GmbH, Winsen / Luhe, Deutschland
Vortexgerät, Typ VF 2		Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik/Deutschland
AmpliTaQ DNA-Polymerase	5 U/µl	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, USA
GeneAmp dNTPs	10 mM	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, USA
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, USA
10 X PCR-Puffer	100 mM	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, USA
Primer SAP 1 –EF	100 µM	Gibco Life Technologies, Eggenstein / Deutschland
Aqua dest.		Boehringer, Mannheim/Deutschland

### **Gelelektrophorese**

Gelelektrophoreseapparatur, Typ HE 33			Hoefer, San Francisco, CA / USA
Mikrowellengerät, Typ MC 653			Udo Classen GmbH, Kempen, Deutschland
Spannungsquelle, Typ EPS 500/400			Pharmacia LKB, San Francisco, CA / USA
Polaroidkamera, Typ GelCam			Polaroid, Bedfordshire, U.K.
UV-Leuchtkasten, Typ N 90			UniEquip, Martinsried/ Deutschland
Agarose	37,5 mg/25 ml		Life Technologies, Grand Islands, N.Y./USA
10 x TBE	(Tris-HCL, Borsäure, EDTA, Aqua a.i.)		Sigma, St. Louis, Missouri/USA
1 x TE	(Tris-HCL, EDTA, Aqua a.i.)		Sigma, St. Louis, Missouri/USA



## 8. Geräte und Material

Färbelösung :	Ethidiumbromid	Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania/USA
Auftragslösung :	Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
	Xylenol Xylanol	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
	Glycerol	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
	Aqua a.i.	Boehringer, Mannheim / Deutschland
Längenstandard:	HAE III Digest	BioLabs, Beverly, MA/USA

## 9. Patientendaten

### 9.1 Candidagruppe: Kulturelle und molekularbiologische Daten sowie anamnestische Daten

In Fettdruck sind die in die Studie aufgenommen Patientinnen dargestellt.

Nr.	Name	Alter	Kultur Candida albicans	Andere Candida spec.	PCR positiv	S A P 1	S A P 2	S A P 3	S A P 4	S A P 5	S A P 6	S A P 8	S A P 9	EF
1	A. W.	62	X		X	X	X	0	X	0	0	0	0	X
2	B.-W. B.	30	X		X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
3	G.N.	35	0		X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
4	H.S.	25	0		X	0	0	0	0	X	0	X	0	X
5	P.G.	46	X		X	X	0	X	0	0	0	0	0	X
6	R.B.	37	X		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
7	P.K.	26	0		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
8	L.H.	40	0		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
9	B.P.	19	X		X	0	0	X	0	X	0	0	0	0
10	W.C.	39	0		X	0	0	0	X	0	0	X	0	0
11	H.S.	42	X		X	0	0	0	0	0	0	0	X	X
12	N.M.	50	X		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
13	S.H.	23	0		X	X	X	0	X	0	0	0	0	X
14	K.M.	19	X		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
15	F.K.	36	X		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
16	S.F.	23	0		X	X	0	0	X	0	0	X	0	X
17	F.A.	36	0		X	X	0	0	X	0	0	0	X	X
18	M.H.	33	0		X	X	0	0	X	X	0	0	0	X
19	T.S.	26	0		X	X	0	X	X	0	0	0	0	0
20	S.C.	28	X		X	0	0	X	X	0	0	X	0	0
21	R.A.	40	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	J.K.	32	X		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X

## 9. Patientendaten

23	P.G.	37	X		X	0	0	X	X	0	0	X	0	X
24	S.T.	41	X		X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
25	G.C.	32	0		X	X	0	0	X	0	0	X	X	X
26	M.R.	38	0		X	0	0	0	X	0	0	X	0	X
27	V.-K. C.	54	0		X	0	X	X	0	0	0	X	0	0
28	M.M.	40	0		X	0	0	0	X	0	0	0	0	0
29	S.S.	32	X		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
30	M.A.	51	X		X	X	0	0	X	X	0	X	0	X
31	O.L.	35	0		X	0	X	0	0	X	0	0	0	0
32	V.N.	33	0		X	0	X	X	0	0	X	0	0	0
33	E.B.	34	X		X	X	0	0	0	0	0	0	0	X
34	U.K.	34	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	D.H.	36	0		X	0	0	X	0	0	0	0	0	0
36	Z.I.	16	0		X	0	0	X	0	0	0	0	0	X
37	C.B.	36	0		X	X	0	0	0	0	0	X	0	X
38	E.O.	27	0		X	0	0	0	0	0	0	X	0	X
39	M.P.	37	0	tropicalis	X	0	0	0	0	0	X	0	X	X
40	W.M.	38	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	P.E.	38	X		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
42	P.H.	36	0	tropicalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	W.I.	50	0		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
44	C.-B. C.	28	X		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
45	K.S.	48	0		X	0	0	0	0	X	0	0	0	X
46	T.V.	41	X		X	X	X	0	0	0	0	0	0	X
47	B.C.	42	0	glabrata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	M.H.	35	0	glabrata	X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
49	M.O.	28	X		X	0	0	0	0	0	0	X	0	X
50	B.G.	24	0	glabrata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	B.H.	43	X		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
52	H.-L. G.	38	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	T.C.	40	0		X	0	X	0	0	X	0	0	0	X

## 9. Patientendaten

54	S.C.	29	0	glabrata	X	0	0	0	0	0	0	X	0	X
55	B.A.	33	X		X	0	X	0	0	X	0	X	0	X
56	K.S.	53	0	glabrata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	F.K.	76	0	glabrata	X	X	0	0	X	0	0	X	0	X
58	D.T.	35	0	glabrata	X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
59	B.J.	22	0	glabrata	X	0	0	0	X	X	0	0	0	X
60	S.R.	31	0	glabrata	X	0	0	0	0	X	0	0	0	X
61	L.A.	27	0	glabrata	X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
62	G.A.	39	X		X	X	0	0	0	0	0	0	X	X
63	N.J.	49	0	glabrata	X	X	0	0	0	0	0	0	0	X
64	G.T.	43	X		X	X	0	0	0	0	0	X	0	X
65	S.B.	43	X		X	0	0	0	0	X	0	X	0	X
66	B.H.	23	X		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
67	H.R.	18	X		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	D.I.	55	X		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	M.P.	43	0		X	0	0	0	X	0	0	0	X	X
70	V.-M. C.	33	X		X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
71	E.M.	30	0		X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
72	M.R.	29	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	M.J.	28	X		X	X	X	X	X	0	X	X	X	X
74	S.D.	44	X		X	X	0	0	X	0	0	X	X	X
75	L.B.	56	X		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
76	B.M.	28	X		X	0	0	0	0	0	0	X	X	X
77	N.M.	27	X		X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
78	N.U.-E.	23	0	krusei	X	0	0	0	X	0	0	X	0	X
79	T.K.	31	0		X	X	0	0	0	0	0	0	0	X
80	R.D.	59	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	H.R.	32	0		X	0	X	0	0	0	0	0	0	X
82	M.P.	31	0		X	0	0	0	0	0	0	X	0	X
83	S.H.	39	0		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
84	B.E.	40	0		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
85	H.A.	31	0	tropicalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## 9. Patientendaten

86	V.S.	53	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	H.J.	40	0		X	X	0	X	0	0	0	0	0	0
88	H.A.	45	X		X	X	0	0	X	X	0	0	0	0
89	R.A.	36	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	J.A.	40	X		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>91</b>	<b>H.J.</b>	<b>27</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>
92	S.M.-A.	45	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	L.A.	23	X		X	X	0	0	0	0	0	0	0	0
94	G.G.	21	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	K.G.	22	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### anamnestische Daten

Nr.	Kontrazeption	Allergie	Geburten	Aborte
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>6</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
<b>11</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>13</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>14</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>15</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>17</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>18</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
19	0	0	2	0
20	1	1	0	0
21	1	0	0	0

## 9. Patientendaten

<b>22</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>23</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>24</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>25</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>26</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
27	0	1	3	1
28	1	1	0	0
<b>29</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>30</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
31	0	0	0	0
32	0	0	0	0
<b>33</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
34	0	0	0	0
35	0	0	0	0
<b>36</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>37</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>38</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
<b>39</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
40	0	0	2	0
<b>41</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
42	0	0	2	0
<b>43</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>44</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>45</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>46</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
47	0	0	3	0
<b>48</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>49</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
50	0	0	0	0
<b>51</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
52	0	0	2	0
<b>53</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
<b>54</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>55</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
56	0	0	2	0
<b>57</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

## 9. Patientendaten

<b>58</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>59</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>60</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>61</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>62</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>63</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>64</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>65</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>66</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
67	0	0	3	0
68	0	0	2	1
<b>69</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>70</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>71</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
72	0	0	0	0
<b>73</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>74</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>76</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>77</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>78</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>79</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
80	2	0	2	1
<b>81</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>82</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>83</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>84</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
85	0	0	0	0
86	0	0	0	0
87	0	0	0	0
88	0	0	0	0
89	0	0	0	0
90	0	0	0	0
91	0	0	0	0
92	0	0	0	0
93	0	0	0	0

## 9. Patientendaten

94	0	0	0	0
95	1	0	1	0



## 9. Patientendaten

### 9.2 Kontrollgruppe: Kulturelle und molekularbiologische Daten sowie anamnestische Daten

Nr.	Name	Alter	Kultur Candida albicans	Andere Candida spec.	PCR positiv	S A P 1	S A P 2	S A P 3	S A P 4	S A P 5	S A P 6	S A P 8	S A P 9	EF
1	K.A.	38	0		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
2	B.M.-H.	42	0		X	0	X	X	0	X	X	0	0	X
3	B.M.	40	0		X	0	0	X	X	0	0	X	0	X
4	H.R.	57	0		X	0	0	0	0	0	X	0	0	X
5	P.L.	43	X		X	X	0	X	0	X	0	X	0	X
6	F.B.	66	0		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
7	O.E.	42	0		X	0	X	0	0	0	0	0	0	0
8	H.C.	46	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	D.U.	68	0		X	0	0	0	0	0	0	0	X	X
10	A.G.	48	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	E.I.	31	X		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
12	H.H.	25	0		X	0	0	0	0	0	0	0	X	0
13	D.J.	20	0		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
14	B.S.	25	0		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
15	B.S.	40	X		X	X	0	0	X	0	0	0	0	X
16	E.S.	30	0		X	X	0	0	0	0	0	X	0	X
17	H.H.	30	0		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
18	W.S.	23	0		X	0	0	0	X	0	0	0	0	X
19	H.J.	26	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	M.U.	38	0		X	0	0	0	0	0	X	0	0	0
21	H.R.	35	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	T.T.	33	X		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
23	S.U.	30	X		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
24	S.U.	36	X		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X
25	F.-H. D.	34	X		X	X	0	X	0	X	0	0	0	X

## 9. Patientendaten

<b>26</b>	<b>B.S.</b>	<b>42</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>	<b>0</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
27	K.A.	42	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	T.T.	31	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>29</b>	<b>G.C.</b>	<b>48</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>
<b>30</b>	<b>L.S.</b>	<b>27</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>
31	L.S.	49	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	H.C.	42	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>33</b>	<b>K.I.</b>	<b>39</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>
34	J.K.	57	0		X	0	0	X	0	0	0	X	0	0
35	W.C.	43	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>36</b>	<b>S.M.</b>	<b>35</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>
<b>37</b>	<b>S.-L. M.</b>	<b>50</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>	<b>0</b>	<b>X</b>
<b>38</b>	<b>P.D.</b>	<b>46</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>
<b>39</b>	<b>M.P.</b>	<b>25</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>	<b>0</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
40	W.M.	48	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## 9. Patientendaten

anamnestische Daten

Nr.	Kontrazeption	Allergie	Geburten	Aborte
1	1	0	2	0
2	0	0	0	0
3	0	0	2	0
4	0	1	0	1
5	0	0	0	0
6	0	1	0	0
7	2	1	0	0
8	2	0	1	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	2	0	2	0
12	0	0	0	0
13	0	0	2	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	2	0
17	0	0	0	0
18	0	0	1	0
19	0	0	2	0
20	1	1	0	0
21	1	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	2	0
25	0	0	0	0
26	0	0	1	0
27	0	0	0	1
28	1	1	0	0
29	0	0	0	0
30	1	1	0	0
31	0	0	0	0
32	0	0	0	0
33	0	1	1	0
34	0	0	0	0

## 9. Patientendaten

35	0	0	0	0
<b>36</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>37</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>38</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>39</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
40	0	0	2	0

## 10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Spitzbart und Herrn Prof. Dr. Dr. Weissenbacher für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit. Bedanken will ich mich auch bei Herrn Dr. Schaller von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität München der mich mit den wesentlichen Arbeitsschritten vertraut gemacht hat. Mein Dank gilt ferner Frau Dr. Vera Tolbert für ihren Einsatz und ihre Mithilfe bei der Bewältigung von vielerlei Problemen, die während der Laborarbeiten auftraten.

## 11. Lebenslauf

Name:	Stefan Brenninger
Geburtsdatum:	30.12.73
Geburtsort:	München
Vater:	Helmut Brenninger
Mutter:	Erni Brenninger
wohnhaft:	Breisacherstr. 8 81667 München
Familienstand:	ledig
Schul Ausbildung:	Grundschule Vaterstetten 09/80-09/84 Gymnasium Vaterstetten 09/84-09/93
Wehrdienst:	09/93-09/94
Studium:	09/94-10/2000 Humanmedizin, LMU-München
Prüfungen:	Ärztliche Prüfung Herbst 2000
seit 01.12.2000	Arzt im Bezirkskrankenhaus Haar, Fachkrankenhaus für Psychiatrie, Psychotherapie und Neurologie, Lehrkrankenhaus der LMU-München